

10088726
12-19-03

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

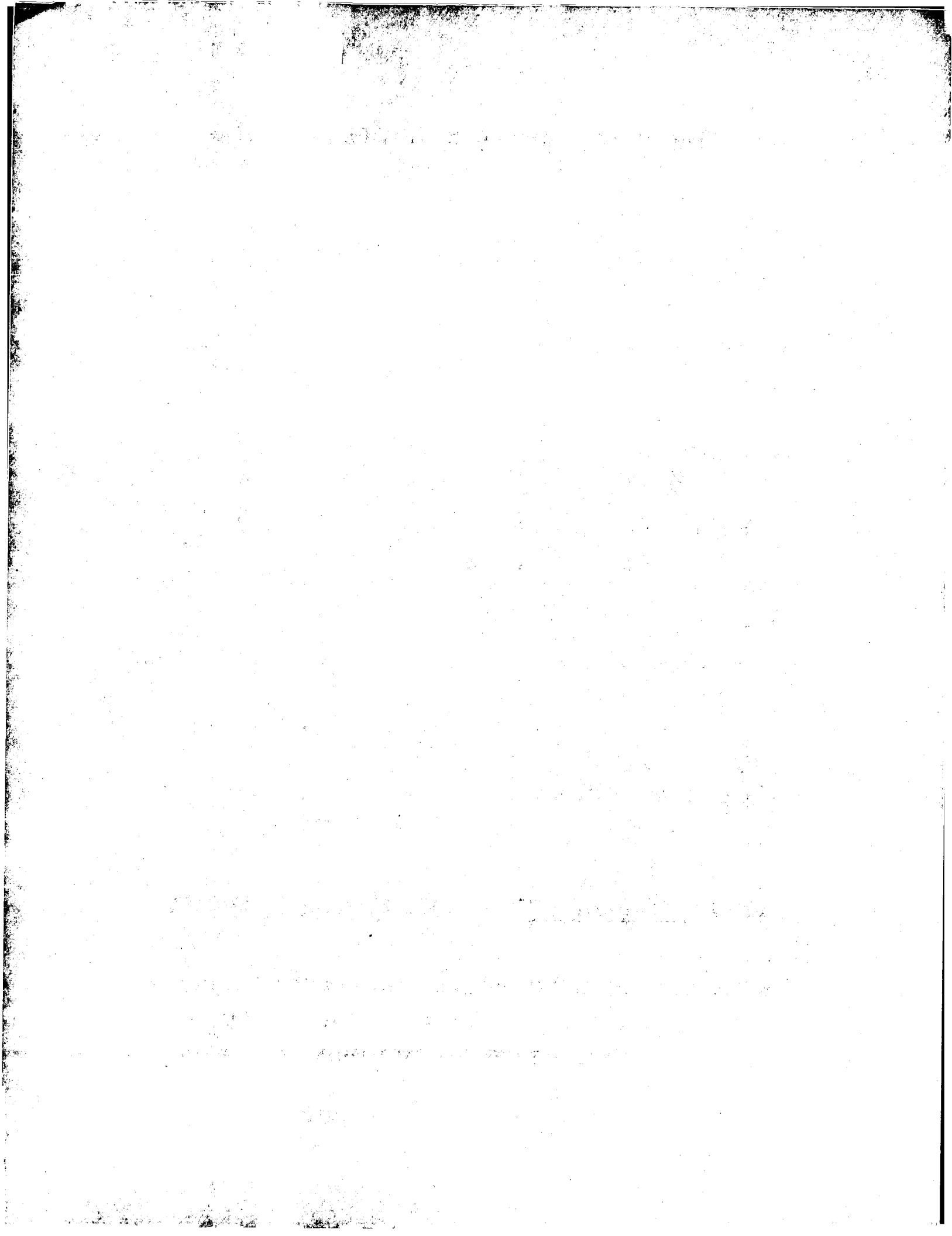
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2001年2月8日 (08.02.2001)

PCT

(10)国際公開番号
WO 01/09349 A1

(51)国際特許分類: C12N 15/57, 9/64, 15/63, 5/06, C07K 16/40, C12Q 1/68, G01N 33/573, A61K 38/48, 31/7052, 48/00 // C12P 21/08, (C12N 9/64, C12R 1:91)

(21)国際出願番号: PCT/JP00/05062

(22)国際出願日: 2000年7月28日 (28.07.2000)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願平11/248036 1999年7月29日 (29.07.1999) JP
特願平11/300253 1999年8月27日 (27.08.1999) JP
60/159,590 1999年10月18日 (18.10.1999) US
特願2000/118776 2000年1月11日 (11.01.2000) JP
60/183,322 2000年2月17日 (17.02.2000) US
特願2000/183767 2000年5月2日 (02.05.2000) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地
Chiba (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 太田紀夫 (OTA, Toshio) [JP/JP]; 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町1-2-7-105 Kanagawa (JP). 磯貝隆夫 (ISOGAI, Takao) [JP/JP]; 〒300-0303 茨城県稻敷郡阿見町大室511-12 Ibaraki (JP). 西川哲夫 (NISHIKAWA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒173-0013 東京都板橋区氷川町27-3-403 Tokyo (JP). 林 浩司 (HAYASHI, Koji) [JP/JP]; 〒299-0125 千葉県市原市有秩台西1-9-446 Chiba (JP). 斎藤 薫 (SAITO, Kaoru) [JP/JP]; 〒292-0056 千葉県木更津市木更津2-8-1-201 Chiba (JP). 山本順一 (YAMAMOTO, Jun-ichi) [JP/JP]; 〒292-0041 千葉県木更津市清見台東3-28-3-A101 Chiba (JP). 石井静子 (ISHII, Shizuko) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那4508-19-202 Chiba (JP). 杉山友康 (SUGIYAMA, Tomoyasu) [JP/JP]; 〒292-0045 千葉県木更津市清見台2-6-23-102 Chiba (JP). 若松 愛 (WAKAMATSU, Ai) [JP/JP]; 〒292-0014 千葉県木更津市高柳1473-4-202 Chiba (JP). 永井啓一 (NAGAI, Keiichi) [JP/JP]; 〒207-0022 東京都東大和市桜が丘3-44-14-9-204 Tokyo (JP). 大槻哲嗣 (OTSUKI, Tetsuji) [JP/JP]; 〒292-0055 千葉県木更津市朝日3-1-10-B102 Chiba (JP). 矢野和宏 (YANO, Kazuhiro) [JP/JP]. 村上弘次 (MURAKAMI, Kohji) [JP/JP]. 神崎

/続葉有/

(54)Title: GENE ENCODING NOVEL SERINE PROTEASE-LIKE PROTEIN

(54)発明の名称: 新規なセリンプロテアーゼ様蛋白質をコードする遺伝子

(57)Abstract: By an oligocap method originally developed for isolating full-length cDNA, a plural number of full-length cDNAs are isolated from a human placental tissue cDNA library. Among these cDNAs, a clone (hC-PLACE1009992) encoding a novel serine protease-like protein is isolated. Further, a mouse cDNA (mC-PLACE1009992) corresponding to this human cDNA is successfully isolated too. C-PLACE1009992 shows a change in the expression in the brain of a patient with Alzheimer's disease compared with the brain of a normal subject, which suggests that it might relate to Alzheimer's disease.

(57)要約:

完全長cDNAを単離するために独自に開発したオリゴキャップ法により、ヒト胎盤組織cDNAライブラリーから完全長cDNAを複数単離し、その中から新規なセリンプロテアーゼ様の蛋白質をコードするクローン (hC-PLACE1009992) を単離した。さらに、該ヒトcDNAに対応するマウスcDNA (mC-PLACE1009992) を単離することにも成功した。C-PLACE1009992の発現は、正常人の脳と比較して、アルツハイマー患者の脳において変動していたことからアルツハイマー病との関連が示唆された。

WO 01/09349 A1



康治 (KANZAKI, Kouji) [JP/JP]. 井上佳久 (INOUE, Yoshihisa) [JP/JP]. 橋本英美 (HASHIMOTO, Emi) [JP/JP]. 鹿島亜季子 (KASHIMA, Akiko) [JP/JP]; 〒573-1153 大阪府枚方市招提大谷2-25-1 ウエルフアイド株式会社 創薬研究所内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsuhi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,

RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

明細書

新規なセリンプロテアーゼ様蛋白質をコードする遺伝子

技術分野

本発明は、新規なセリンプロテアーゼ様蛋白質、その遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

生体内に存在するプロテアーゼは、血液凝固・線溶系のみならず、癌や炎症・アレルギー、免疫病、アルツハイマー病などあらゆる疾患に関与していることが最近明らかにされている。特に活性中心にセリンを有するセリンプロテアーゼ類は、その構造と機能について最もよく研究の進んでいるプロテアーゼであり、その生理作用と疾患との関連についての研究も多くなされている (Barrett AJ, Salvesen G, et al(eds): Proteinase Inhibitors. Amsterdam, Elsevier, 1986)。食物消化作用を担うトリプシンやキモトリプシン、エラスターーゼの異常は肺炎を引き起こす。血液凝固・線溶系を司るトロンビン、XIIa 因子、XIa 因子、Xa 因子、IXa 因子、VIIa 因子や、プラスミン、組織プラスミノゲンアクチベーター、ウロキナーゼなどの異常は、出血症、血栓症、DIC、心筋梗塞などの疾患の原因である。また、食作用に関与するエラスターーゼ、カテプシン、肥満細胞由来キマーゼおよびトリプターゼなどの異常は、炎症や肺気腫、リウマチなどを誘発する。現在アルツハイマー病発症の原因と考えられている β -アミロイド蛋白の蓄積にもセリンプロテアーゼが関与していると考えられている(岩田修永、津吹聰、西道隆臣、医学のあゆみ、189、9-14、1999)。さらにセリンプロテアーゼは補体反応系にも存在しており、古典的経路および第二経路を司る C1r、C1s、factor B、factor D などは炎症やリウマチ、アレルギーに関与するとされている。さらに最近見出

された第三の補体活性化経路であるレクチン経路(遠藤雄一、藤田禎三、蛋白質核酸酵素、45、671-678、2000)に携わる MASP-1 および MASP-2 も、その C 末端側にセリンプロテアーゼドメインを有していることが明らかにされている。

一方、セリンプロテアーゼ様構造を有しながら、蛋白質分解活性を持たないドメインも存在している。肝実質細胞の増殖を担う因子 HGF (Hepatocyte Growth Factor) は、シグナルペプチドが除去されて、Pro-HGF として細胞外に分泌された後、セリンプロテアーゼである HGF アクチベーターにより切断されて重鎖と軽鎖が S-S 結合により結合した成熟型の HGF が形成される。このうち軽鎖領域はセリンプロテアーゼの機能ドメインと相同性のある構造を持っているが、プロテアーゼ活性は検出されない。しかし HGF の肝細胞増殖作用や腫瘍抑制作用の活性発現には重要なドメインである(大西智和、大工原 恒、肝胆膵、38、613-621、1999)。

以上のように、セリンプロテアーゼおよびセリンプロテアーゼ様ドメインは生体内で重要な働きを担っており、医薬品として開発していく上で重要な創薬のターゲットであると考えられる。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、新規なセリンプロテアーゼ様蛋白質、その遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することにある。

本発明者らは、上記の課題を解決するために、まず、完全長cDNAを単離するために独自に開発したオリゴキヤップ法により、ヒト胎盤組織cDNAライブラリーから完全長cDNAを複数単離した。単離したcDNAの一つにつき塩基配列を決定し、その構造解析を行なったところ、公知のセリンプロテアーゼに保存されている配列を保持していたため、該cDNAは新規なセリンプロテアーゼ様の蛋白質をコードしていることが判明した(このクローンを「hC-PLACE1009992」と命名した)。また、本発明者等は、該ヒトcDNAに対応するマウスcDNAを単離することにも成功した

(このクローンを「mC-PLACE1009992」と命名した。ヒトおよびマウスのクローンを総称して「C-PLACE1009992」と称する)。C-PLACE1009992の発現は、正常人の脳と比較して、アルツハイマー患者の脳において変動していたことからアルツハイマー病との関連が示唆された。また紫外線照射によって発現が低下することから皮膚癌への関連も考えられる。

本発明は、新規なセリンプロテアーゼ様蛋白質C-PLACE1009992および該蛋白質をコードするDNA、並びにそれらの製造および用途に関し、より詳しくは、

(1) 下記(a)から(d)のいずれかに記載のDNA、

(a) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

(b) 配列番号：1または3に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。

(c) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。

(d) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。

(2) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA、

(3) (1)または(2)に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド、

(4) (1)または(2)に記載のDNAが挿入されたベクター、

(5) (1)若しくは(2)に記載のDNAまたは(4)に記載のベクターを保持する形質転換体、

(6) (5)に記載の形質転換体を用いて蛋白質またはペプチドを発現さ

せる工程、および発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、(3)に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (3)に記載の蛋白質またはペプチドに結合する抗体、

(8) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、

(9) (3)に記載の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法であつて、

(a) 該蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程

(c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、および

(10) (1)若しくは(2)に記載のDNA、(3)に記載の蛋白質若しくはペプチド、または(4)に記載のベクターを含有する医薬組成物、を提供するものである。

本発明は、新規な蛋白質「C-PLACE1009992」を提供する。本発明の蛋白質に含まれるヒト由来のC-PLACE1009992（「hC-PLACE1009992」と称する）蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：2に、該蛋白質をコードするcDNAの塩基配列を配列番号：1に示す。また、マウス由来のC-PLACE1009992（「mC-PLACE1009992」と称する）蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：4に、該蛋白質をコードするcDNAの塩基配列を配列番号：3に示す。C-PLACE1009992遺伝子は、セリンプロテアーゼの特徴を有する737アミノ酸（ヒト由来）または720アミノ酸（マウス由来）からなる蛋白質をコードする。C-PLACE1009992遺伝子は、正常人の場合と比較してアルツハイマー患者の海馬で顕著に発現の低下が認められたためアルツハイマー病と関連していることが示唆される。このため本発明の遺伝子の発現量を測定することによるアルツハイマー病の診断やアルツハイマー病の予防剤または治療剤のスクリーニ

ング等を行うことが考えられる。また、本発明のマウス由来の遺伝子を用いることにより、ノックアウトマウスの調製やアルツハイマー病モデル動物の調製、さらに、同モデル動物を用いたアルツハイマーの予防剤や治療剤のスクリーニング等を行うことも考えられる。

C-PLACE1009992蛋白質は、組換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組換え蛋白質は、例えば、後述するように本発明の蛋白質をコードするDNAを挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現した蛋白質を精製することにより調製することが可能である。一方、天然の蛋白質は、例えば、後述する本発明の蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション (例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) Nucleic Acids Res. 17:3129-3144」参照) などにより本発明の蛋白質を調製すること也可能である。

本発明には、本実施例において同定されたヒト由来のC-PLACE1009992蛋白質と機能的に同等な蛋白質が含まれる。このような蛋白質には、例えば、配列番号：2または4に記載のC-PLACE1009992蛋白質の変異体、ホモログ、バリエントなどが含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質がC-PLACE1009992蛋白質と同様の生物学的機能あるいは生化学的機能を有することを指す。このような機能としては、セリンプロテアーゼとしての機能あるいはアルツハイマー病に関係した機能が挙げられる。セリンプロテアーゼの機能としては、例えば、血液凝固・線溶系や補体活性系に見られるようなカスケードシステムを担うプロテアーゼとして、他の蛋白質を切断することにより反応系を制御するという機能や

、あるいはHGFのセリンプロテアーゼ様構造に見られる細胞を増殖させる機能が挙げられる。セリンプロテアーゼの異常は、例えば、血液凝固・線溶系の制御・調節系に破綻をきたし、ひいては出血症や血栓症、心筋梗塞等の疾病を引き起こす。アルツハイマー病に関係した機能としては、補体系の異常 (Rogers, J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10016-10020, 1992) やアルツハイマー病発症の原因と考えられている β -アミロイド蛋白質の蓄積 (岩田 修永、津吹 総、西道 隆臣、医学のあゆみ、189、9-14、1999) に関連した機能が挙げられる。

これら本実施例において同定された蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、当業者であれば、例えば、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法 (例えば、部位特異的変異誘発法 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5)) を利用して調製することができる。また、このような蛋白質は、自然界におけるアミノ酸の変異により生じることもある。本発明には、このように本実施例において同定された蛋白質と同等の機能を有する限り、そのアミノ酸配列 (配列番号 : 2 または 4)において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより異なる蛋白質が含まれる。

蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、30アミノ酸以内であり、好ましくは10アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内 (例えば、3アミノ酸以内) である。置換されるアミノ酸は、蛋白質の機能の保持の観点から、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Ty r、Asn、Glnが挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。

本実施例において同定された蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、当業者に周知

のハイブリダイゼーション技術(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4)、あるいは 遺伝子增幅技術(PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4)を利用して単離することも可能である。即ち、当業者であれば、本実施例において同定された蛋白質をコードするDNA(配列番号: 1または3)またはその一部をプローブとして、あるいは該DNAと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、該DNAとハイブリダイズするDNAを単離することができる。さらに単離したDNAを基に、該DNAによりコードされる蛋白質を調製することができる。本発明には、本実施例において同定された蛋白質と同等の機能を有する限り、これら蛋白質をコードするDNAとハイブリダイズするDNAによりコードされる蛋白質が含まれる。機能的に同等な蛋白質を単離するための生物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ等の脊椎動物が挙げられるが、これらに制限されない。

機能的に同等な蛋白質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジエントな条件は、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.1xSSC、0.1% SDS、65°C」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同意を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素(例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など)を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子增幅技術を利用して単離される蛋白質は、配列番号: 2または4に記載の本発明の蛋白質と比較して、

通常、そのアミノ酸配列において高い相同意を有する。高い相同意とは、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%以上）の配列の同一性を指す。アミノ酸配列の相同意は、BLAST Xによる相同意検索により決定することができる。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを提供する。本発明の蛋白質の部分ペプチドは、例えば、本発明の蛋白質に結合する抗体の調製に利用することができる。本発明の部分ペプチドは、少なくとも7アミノ酸、好ましくは9アミノ酸以上、より好ましくは12アミノ酸以上、より好ましくは15アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

本発明は、また、本発明の蛋白質をコードするDNAを提供する。本発明のDNAとしては、本発明の蛋白質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNAの他、ゲノムDNA、化学合成DNAなども含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。本発明の蛋白質をコードするDNAは、上記のように、配列番号：1または3に記載のDNA配列もしくはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれらDNA配列の情報に基づき設計したプライマーを用いた遺伝子増幅法（PCR）等の常法により単離することが可能である。

本発明は、また、本発明の蛋白質をコードするDNAが挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター（Stratagene社製）などが好ましい。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター（プロメガ社製）を、大腸菌における発現であればpETベクター（Novagen社製）

を、培養細胞における発現であればpME18S-FL3ベクター（GenBank Accession No AB009864）を、生物個体における発現であればpME18Sベクター（Mol Cell Biol. 8:466～472(1988)）を、好適に用いることができる。本発明の蛋白質をコードするDNAのベクターへの挿入は常法、例えば、制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4～11.11）により行うことができる。

本発明は、また、本発明の蛋白質をコードするDNAまたは該DNAが挿入されたベクターを保持する形質転換体を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。宿主細胞は、例えば、本発明のタンパク質の製造のために使用することができる。タンパク質製造のための產生系は、*in vitro*および*in vivo*の產生系がある。*in vitro*の產生系としては、真核細胞を使用する產生系や原核細胞を使用する產生系が挙げられる。真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。また、本発明の宿主細胞には、C-PLACE1009992蛋白質の機能解析やC-PLACE1009992蛋白質を利用したその機能阻害剤や機能促進剤のスクリーニングのために用いる目的の細胞も含まれる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9）、リポフェクタミン法（GIBCO-BRL社製）、マイクロインジェクション法などの方法で行うことが可能である。形質転換体からのC-PLACE1009992蛋白質の調製は、当業者に公知の蛋白質の分離・精製法を利用して行なうことができる。

本発明はまた、配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオ

チド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

このようなポリヌクレオチドは、本発明の蛋白質をコードするDNAを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のDNAを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp～100bp、好ましくは15bp～35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

また、本発明のポリヌクレオチドには、本発明のC-PLACE1009992蛋白質の発現を抑制するためのアンチセンスが含まれる。アンチセンスは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、好ましくは2000bp以内の鎖長を有する。このようなアンチセンスは、例えば、配列番号：1または3に記載のDNAの配列情報を基にホスホロチオネート法 (Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)) などにより調製することが可能である。

本発明のDNAやそのアンチセンスには、例えば、遺伝子治療への応用が考えられる。本発明のDNAを利用した遺伝子治療の標的となる疾患としては、例えば、アルツハイマー病が考えられる。これら分子を遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo法やin vivo法などにより患者へ投与を行えばよい。

本発明は、また、本発明の蛋白質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従いアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成して家兔に免疫することにより得ることが可能であり(*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12~11.13)、一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製した蛋白質を用いてマウスを免疫し、脾臓細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質の精製に加え、例えば、これら蛋白質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、ヒト抗体遺伝子を染色体に導入したマウス (例えば、「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J. et al.(1997) Nat.Genet.15:146-156」参照) に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組換えによって調製することができる(*Methods in Enzymology* 203, 99-121(1991))。

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、および(c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む。

具体的な方法としては、例えば、本発明の蛋白質のアフィニティーカラムに被検試料を接触させ精製する方法、twoハイブリッドシステムを利用する方法、ウエストウエスタンプロッティング法、ハイスループットスクリーニングによる方法など多くの公知の方法を利用することができる。また、BIACORE (Pharmacia社)などの測定装置を利用して、本発明の蛋白質と被検化合物との結合を評価することによりスクリーニングを行うこともできる。スクリーニングに用いる被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。

このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明の蛋白質の活性を促進または阻害する化合物の候補となる。また、生体内において、本発明の蛋白質とこれと相互作用する分子との該相互作用を阻害する化合物の候補となる。

本発明の遺伝子、その蛋白質、該遺伝子の発現を制御する化合物、あるいは該蛋白質の活性を制御する化合物を医薬品として用いる場合には、それ自体を医薬品として用いることも可能であるが、公知の製剤学的方法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせて製剤化して用いることが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、DNAを治療薬として使用する場合には、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、患者に投与することも考えられる。投与量、投

与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能であろう。

図面の簡単な説明

図1は、C-PLACE1009992と他のセリンプロテアーゼとのセリンプロテアーゼ・ドメインについてのアミノ酸配列の整列を示す。

図2は、pcDNA3.1(-)/C-PLACE1009992/MycHisの構造を示した図である。

図3は、pENTRI1A/C-PLACE1009992/MycHisの構造を示した図である。

図4は、pDEST8/C-PLACE1009992/MycHisの構造を示した図である。

図5は、ヒトおよびマウス由来のC-PLACE1009992のアミノ酸配列を整列した図である。

図6は、図5の続きの図である。

図7は、ヒト由来C-PLACE1009992と既知のマウスEST配列を整列した図である。

図8は、図7の続きの図である。

図9は、図8の続きの図である。

図10は、図9の続きの図である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. (1982) : "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

[実施例1] オリゴキャップ法によるヒト胎盤組織からのcDNAライブラリーの作製

ヒト胎盤組織より、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)記載の方法によりmRNAを抽出

した。さらに、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)記載の方法にしたがって、オリゴ(dT)セルロースカラム (Collaborative labs) を用い、poly(A)+ RNAを精製した。

該poly(A)+ RNAより、オリゴキヤップ法 [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)]によりcDNAライブラリーを作製した。配列番号：7で表される配列からなるオリゴキヤップリンクー(合成RNA)および配列番号：8で表される配列からなるオリゴ(dT)アダプターを用いて、文献〔鈴木・菅野, 蛋白質核酸 酵素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)〕に記載してあるようにBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) 処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。次いで、配列番号：9で表される5'末端側および配列番号：10で表される3'末端側のPCRプライマーを用い、PCR (polymerase chain reaction)により2本鎖cDNAに変換し、得られたDNA断片をSfiIで切断した。次いで、DraIIIで切断したベクターpME18SFL3 (GenBank AB009864) にcDNAの方向性を決めてクローニングし、cDNAライブラリーを作製した。pME18SFL3のクローン化部位は非対称性のDraIIIサイトとなっており、cDNA断片の末端にはこれと相補的なSfiI部位を付加しているので、クローン化したcDNA断片はSRαプロモーターの下流に一方向性に挿入される。

[実施例2] ヒト胎盤組織から作製したcDNAライブラリー由来のcDNAクローンの解析

(1) cDNAクローンの単離

実施例1で作製したcDNAライブラリーの一部をジーンバルサー (Biorad社製) を用いてエレクトロポレーション法で大腸菌DH10B株に導入した。形質転換体は、アンピシリンを50μg/ml含有するLB寒天培地上で培養して選択した。これらの形質転換体をアンピシリンを50μg/ml含有するLB培地で一晩培養し、プラスミド自動抽出機PI100 (クラボウ社製) を用いてプラスミドを抽出した。

(2) 単離されたcDNAクローンの塩基配列の解析

これらの形質転換体より得たクローンのプラスミドDNAについて、DNAシーケンシング試薬(BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製)を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応後、DNAシーケンサー(ABI PRISM 377, PE Biosystems社製)で各cDNAクローンの5'末端または3'末端からの塩基配列を解析した。

5'末端側からの塩基配列の決定には配列番号：11で表されるME761FWを、3'末端側からの塩基配列の決定には配列番号：12で表されるME1250RVをシーケンス用プライマーとして用いた。

(3) cDNAクローンの5'末端配列と3'末端配列のクラスター化

(2)で決定したcDNAクローンの5'末端配列と3'末端配列を、それぞれ別々にクラスタリングした。すなわち、cDNAクローンの決定した5'末端及び3'末端からのシングルパスシーケンスデータは、各配列データとの間でBLAST解析を行い、同一遺伝子に由来すると思われるクローンのグループ化を行った。5'末端配列では相同性95%以上のコンセンサス配列が300塩基対以上、3'末端配列では相同性90%以上のコンセンサス配列が200塩基対以上の場合、同一グループとした5'末端配列グループ3'末端配列グループはさらに、同一クローンの5'末端配列と3'末端配列が同一グループ(クラスター)に属するようグループ(クラスター)化処理を行った。

(4) cDNAクローン配列の特徴付け

クローン配列の5'末端配列データは、次の方法に基づいて特徴付けした。

- (1) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により、ヒトや他生物のmRNA配列(権利化された配列を含む)やヒトEST配列に対して同一であるかを確認する。
- (2) ヒトmRNA配列やヒトEST配列より5'末端端が長いかを確認する。
- (3) 全長性を予測するATGprプログラム[A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing proj

ects. *Bioinformatics* 14: 384-390 (1998)]により5'末端配列中のすべての開始コドンに由来するATGpr1、ATGpr2値を決定する。

(4) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により同一としたヒトEST配列数を決定する。

また、クローン配列の3'末端配列データの特徴付けは前出の(1)および(4)について行った。

これら特徴付けを行ったクローン配列のデータをもとに新規でかつ全長である可能性の高いcDNAクローンの選抜を行った。

(5) ヒトmRNA配列やヒトEST配列に対しての同一性5'末端の長さの比較

クローン配列の5'末端、および3'末端配列の、ヒトや他生物のmRNA配列に対する同一性は、各配列との比較配列部分の長さが200塩基以上で、94%以上一致の場合に同一と見なした。ヒトEST配列に対する同一性は5'末端配列との比較配列部分の長さが200塩基以上で、90%以上で一致の場合に同一と見なした。

ヒトmRNA配列を比較配列とし、5'末端の長さを比較する際には5'末端配列の長さがヒトmRNA配列より長い場合、または5'末端配列が翻訳開始コドンを含む場合、全長とした。比較対象配列がESTの場合には、データベース中のヒトEST配列より長く5'末端が伸びている場合、あるいは5'末端が短いクローンでも両者の差が50塩基以内である場合を便宜的に全長とし、それ以上短い場合を非全長とした。

(6) ATGprによる全長性の予測

全長性の予測にはATGpr [A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. *Bioinformatics* 14: 384-390 (1998)]による解析結果を用いた。ATGpr1値は計算値から全長である可能性を予測する値であり、ATGpr1値が高いほど全長である可能性が高い。なお、最大ATGpr1値及び最大ATGpr2値とは、クローン配列の5'末端配列に含まれるすべての開始コドンから予測されるATGpr1値及びATGpr2値の最大値を示し、特徴付けにはこの値を用いた。

(7) 相同性検索による同一EST配列数からの新規性の予測

5'末端配列3'末端配列それぞれに対して、GenBankを用いた相同性検索から求めた。ヒトEST配列に対しては、5'末端配列との比較配列部分の長さが200塩基以上にわたって90%以上で一致する場合に同一とした。EST配列数はそのまま特徴付けに用い、新規性の指標とした。mRNA配列ばかりでなく、EST配列に対しても同一でない5'末端配列および3'末端配列をもつクローンは、新規な配列をコードする遺伝子である。同様に、同一のEST配列数が少ない5'末端配列、あるいは3'末端配列をもつクローンもまた、新規な配列をコードするcDNAクローンであると判定した。

(8) クラスターの特徴付け

5'末端配列3'末端配列をグループ化したクラスターを、次の観点に基づいて特徴付けした。

(1) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により、ヒトや他生物のmRNA配列（権利化された配列を含む）やヒトEST配列に対して同一であるか。

クラスターに含まれるすべての5'末端配列3'末端配列のうち、1配列でもmRNA配列に対して同一であった場合、そのクラスターはmRNA配列に対して同一なクラスターとした。

(2) ヒトmRNA配列やヒトEST配列より5'末端が長いか。

クラスターに含まれるすべての5'末端配列がmRNA配列やヒトEST配列に対して非全長であった場合、そのクラスターはmRNA配列やヒトEST配列に対して非全長であるクラスターとした。

(3) 全長性を予測するATGprプログラムによる5'末端配列中のすべての開始コドンに由来するATGpr1値およびATGpr2値。

全長性を予測するATGprプログラム [A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. Bioinformatics 14: 384-390 (1998)] による5'末端配列中のすべての開始

コドンに由来するATGpr1値は、クラスターに含まれる5'末端配列すべてに対してATGpr1値の最大値を、クラスターにおけるATGpr1値とした。ATGpr2値も同様にした。

(4) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により同一としたヒトEST配列数。

クラスターに含まれる5'末端配列3'末端配列それぞれに対してEST配列数の最大値を求め、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数3'末端配列の同一EST配列数とした。

(9) 特徴付けからのクラスターの選抜方法

特徴付けにより得られたデータから、まず、ヒトや他生物のmRNA配列（権利化された配列を含む）と同一なクラスター、及び非全長なクラスターを除いた。それらクラスターの中から、次の条件のいずれかを満たすものを選抜した。

(a) クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が20以下で、クラスターにおけるATGpr1値が0.3を越えるクラスター。

(b) クラスターにおけるATGpr1値が0.3以下のクラスターであっても、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が5以下で、かつ、クラスターにおける3'末端配列の同一EST配列数も5以下で、かつ、クラスター内に複数のクローニング含まれるクラスター。

(c) クラスターにおけるATGpr1値が0.3以下のクラスターであっても、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が0で、かつ、クラスターにおける3'末端配列の同一EST配列数が1以上であるクラスター。

(d) クラスターにおけるATGpr1値が0.3以下のクラスターであっても、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が1以上5以下で、かつ、クラスターにおける3'末端配列の同一EST配列数が0であるクラスター。

(a)で選抜されたクラスターには、少なくとも1クローニングは新規性も、全長性も高いクローニングが含まれている。(b),(c),(d)で選抜されたクラスターには、全長率

は低くなるものの、依然として全長で、新規なクローニングが含まれている。

(10) クラスターからのクローニングの選抜方法

同一クラスター内に1クローニングしか含まないものについては、そのクローニングを選抜した。同一クラスター内に複数のクローニングを含む場合で、ATGpr1値が0.3より大きなクローニングが複数ある場合は、ATGpr1値がより大きい方のクローニングを選択した。

同一クラスター内に複数のクローニングを含む場合で、ATGpr1値が0.3以下のクローニングが複数ある場合、ATGpr2値が0.3より大ならば、ATGpr2値がより大きい方のクローニングを選択した。また、同一クラスター内に複数のクローニングを含む場合で、ATGpr1値、ATGpr2値とともに0.3以下でも、クラスター内でATGpr1値、ATGpr2値がともに最大値をとるクローニングがあるならば、そのクローニングを選択した。同一クラスター内に複数のクローニングを含む場合で、上記のようなATGpr値での選抜ができなかった場合は、5'末端配列3'末端配列及びヒトEST配列を用いてアセンブルすることにより、より5'末端側に長いクローニングを選抜した。アセンブルには、Sequencher (Gene Codes社製) 等を利用し、一部、アセンブルすることによっても決められなかった場合は、対象クローニングすべてを全長と判断した。

(11) cDNAクローニングの全長配列の解析

(1)～(10)のようにして選抜した、新規である可能性が高いと判断されたヒト胎盤組織由来のcDNAクローニングについて、全長cDNAの塩基配列を決定した。

塩基配列は主に、カスタム合成DNAプライマーを用いたダイテオキシターミネーター法によるプライマーウォーキング（カスタム合成DNAプライマーを用い、PE Biosystem社製のDNAシーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応後、同社製のシーケンサーでDNA塩基配列を解析）によって決定した。全長塩基配列は上記方法により決定された部分塩基配列を完全にオーバーラップさせ最終的に確定した。次に、決定された全長のcDNAの塩基配列から推定アミノ酸配列を求めた。その一つである、cDNAクローニングC- PLACE1009992の塩基配列を配列番号：1に示した。また全長塩基配列から推定されたcDNAクローニングC- PLACE1009992がコ-

ドする遺伝子産物のアミノ酸配列を配列番号：2に示した。

(12) ATGprとESTiMateFLでのcDNAの5'-末端の全長率の評価

ATGprは、ATGコドンの周辺の配列の特徴から翻訳開始コドンであるかどうかを予測するためにヘリックス研究所のA. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindellsにより開発されたプログラムである [A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells, Bioinformatics, 14: 384-390 (1998); <http://www.hri.co.jp/atg/pr/>]。結果は、そのATGが真の開始コドンである期待値（以下ATGpr1と記載することもある）で表した（0.05-0.94）。このプログラムを全長率65%のオリゴキヤップ法で作製したライブラリーからのcDNAクローンの5'-末端配列に適用してATGpr1値を0.6以上でクローンを選択した場合、全長クローン（ORFのN-末端までもつクローン）評価の感度と特異性はともに82~83%まで上昇した。C-PLACE1009992の最大ATGpr1値は0.89であった。

[実施例3] 紫外線傷害関連遺伝子の解析

紫外線は健康に少なからず影響を及ぼすことが知られている。近年はオゾン層破壊に伴って紫外線傷害にさらされる機会が多くなっており、皮膚癌などの危険因子として認識されてきている (United States Environmental Protection Agency: Ozone Depletion Home Page, <http://www.epa.gov/ozone/>)。紫外線が皮膚表皮細胞に作用して発現変化する遺伝子は、皮膚の紫外線傷害に関すると考えられる。

紫外線照射した初代培養皮膚由来線維芽細胞を培養して、発現変化する遺伝子を探査した。初代培養皮膚由来線維芽細胞 (Cell Applications社製) は、培養皿にコンフルエントに培養して、254 nmの紫外線を10,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 照射した。

細胞からのmRNAの抽出は、未照射の細胞、照射後4時間または24時間培養した細胞を対象に、FastTrackTM 2.0 mRNA isolation kit (Invitrogen社製) を用いて行った。ハイブリダイゼーション用のプローブのラベリングは、このmRNA 1

.5 μgを用いて、以下に述べる方法にしたがって行った。データはn = 3で取得し、紫外線刺激ありの細胞のシグナル値と、なしの細胞のシグナル値を比較した。比較には二標本t検定の統計処理を行って、シグナル値の分布に有意に差があるクローンを、p < 0.05で選択した。本解析は、シグナル値の低いクローンであっても差を統計的に検出できる。したがって40以下のシグナル値のクローンに対しても評価を行った。

紫外線未照射の皮膚由来線維芽細胞、および紫外線照射した皮膚由来線維芽細胞の、各cDNAの発現を以下の操作にしたがって測定した。

それぞれ細胞の各遺伝子についてシグナル値の平均 (M_1, M_2) と標本分散 (s_1^2, s_2^2) を求め、比較する2つの細胞の標本分散から合成標本分散 s^2 を求めた。t = $(M_1 - M_2)/s/(1/3+1/3)^{1/2}$ を求めた。自由度4としてt分布表の有意水準の確率Pである0.05と0.01のt値と比較して、値が大きい場合にそれぞれP<0.05、またはP<0.01で両細胞の遺伝子の発現に差があると判定した。C-PLACE1009992は、紫外線照射によって、4時間後または24時間後に発現が減少した。

[実施例4] DNAアレイの作製と発現レベルの測定

ナイロン膜スポット用のDNAは以下のように調製した。すなわち、プラスミドを保持する大腸菌を96穴プレートの各ウェルに培養し (LB培地で37°C、16時間)、その培養液の一部を、96穴プレートの10μLずつ分注した滅菌水中に懸濁し、100°Cで10分間処理した後、PCR反応のサンプルとして使用した。PCRはTaKaRa PCR Amplification Kit (宝社製) を用い、プロトコールに従って1反応20μLの反応溶液で行った。プラスミドのインサートcDNAを増幅するために、プライマーはシーケンシング用のプライマーME761FW (5' tacggaaagtgttacttctgc3' / 配列番号: 1 1) とME1250RV (5' tgtgggaggttttctcta3' / 配列番号: 1 2) のペア、またはM13M4 (5' gttttccaggcacgac3' / 配列番号: 1 3) とM13RV (5' caggaaacagctatgac3' / 配列番号: 1 4) のペアを使用した。PCR反応は、GeneAmp System9600 (PEバイオシステムズ社製) で、95°C 5分間処理後、95°C10秒、68°C1分間で10サイク

ルし、さらに98°C20秒間、60°C3分間で20サイクル行い、72°C10分間で行った。PCR反応後、2 μLの反応液を1%アガロースゲル電気泳動して、臭化エチジウムでDNAを染色し、増幅したcDNAを確認した。増幅できなかったものは、そのcDNAインサートをもつプラスミドを、アルカリ抽出法 (J Sambrook, EF Fritsh, T Maniatis, Molecular Cloning, A laboratory manual / 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) で調製した。

DNAアレイの作製は以下のように行った。384穴プレートの各ウェルにDNAを分注した。ナイロン膜（ペーリンガー社製）へのDNAのスポットティングは、Biomek2000ラボラトリーオートメーションシステム（ベックマンコールター社製）の384ピンツールを用いて行った。すなわち、DNAの入った384穴プレートをセットした。そのDNA溶液に、ピンツールの384個の独立した針を同時に浸漬し、DNAを針にまぶした。その針を静かにナイロン膜に押し当てることによって、針に付着したDNAをナイロン膜にスポットティングした。スポットしたDNAの変性および、ナイロン膜への固定は定法 (J Sambrook, EF Fritsh, T Maniatis, Molecular Cloning, A laboratory manual / 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従って行った。

ハイブリダイゼーションのプローブとしては、ラジオアイソトープでラベリングした1st strand cDNAを使用した。1st strand cDNAの合成はThermoscript^(TM) RT-PCR System (GIBCO社製) を用いて行った。すなわち、ヒトの各組織由来mRNA (Clontech社製) の1.5 μgと、1μL 50 μM Oligo (dT)20を用いて、50 μCi [$\alpha^{33}P$]dATPを添加して付属のプロトコールに従って1st strand cDNAを合成した。プローブの精製は、ProbeQuant^(TM) G-50 micro column (アマシャムファルマシアバイオテック社製) を用いて付属のプロトコールに従って行った。次に、2 units E. coli RNase Hを添加して、室温で10分間インキュベートし、さらに100 μg ヒトCOT-1 DNA (GIBCO社製) を添加して、97°Cで10分間インキュベート後、氷上に静置してハイブリダイゼーション用のプローブとした。

ラジオアイソトープラベルしたプローブの、DNAアレイへのハイブリダイゼーションは、定法 (J Sambrook, EF Fritsh, T Maniatis, Molecular Cloning, A laboratory manual / 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従って行った。洗浄は、ナイロン膜を洗浄液1 (2X SSC, 1% SDS) 中で、室温（約26°C）で20分間のインキュベートを3回洗浄した後、洗浄液2 (0.1X SSC, 1% SDS) 中で、65°Cで20分間の洗浄を3回行った。オートラジオグラムは、BAS2000（富士写真フィルム社製）のイメージプレートを用いて取得した。すなわち、ハイブリダイゼーションしたナイロン膜をサランラップに包み、イメージプレートの感光面に密着させて、ラジオアイソトープ感光用のカセットに入れて、暗所で4時間静置した。イメージプレートに記録したラジオアイソトープ活性は、BAS 2000を用いて解析し、オートラジオグラムの画像ファイルとして電子的に変換して記録した。各DNAスポットのシグナル強度の解析は、Visage High Density Grid Analysis Systems (ジェノミックソリューションズ社製) を用いて行い、シグナル強度を数値データ化した。データはDuplicateで取得し、その再現性は2つのDNAフィルターを1つのプローブでハイブリダイゼーションして、両フィルターで対応するスポットのシグナル強度を比較した。全スポットの95%が、相当するスポットに対して2倍以内のシグナル値であり、相関係数は $r=0.97$ である。データの再現性は十分といえる。

[実施例 5]

C-PALCE1009992の塩基配列をすでに報告されている配列と解析プログラム (BLAST2.0) を用いて比較したところ、表1に示す配列が有意な相同性を示した。

表 1

| Hit | Expect | 相同性 (%) |
|--------|--------|---------|
| S77064 | 6e-63 | 34 |
| P28175 | 1e-62 | 34 |
| P48740 | 1e-22 | 29 |

また、C-PLACE1009992のアミノ酸配列を、すでに報告されている配列と上記解析プログラム (BLAST2.0) を用いて比較したところ、表 1 に示すEST配列が有意な相同性を示した。

C-PLACE1009992と上記解析プログラムにて同定されたクローンを含むセリンプロテアーゼとをプロテアーゼドメインについて整列させた結果を図 1 に示す。C-PLACE1009992は、@印をつけた521番目のH(His)と576番目のD(Asp)が他のセリンプロテアーゼと同様に保存されており、セリンプロテアーゼ様のドメインを有することがわかった。682番目のアミノ酸はD(Asp)であることから、K(Lys)またはR(Arg)を持つペプチドを認識する蛋白質であると考えられる。

[実施例 6]

C-PLACE1009992のアミノ酸配列をクエリーとし、Pfam ver3に含まれる検索ツール

Pfam HMM Search (HMMPFAM) を用いて検索した。その結果、CUBドメイン、CCPドメイン、EGFドメイン、セリンプロテアーゼドメインを有することが判明した (表 2)。

表2

| Hit | Score | Expect | Q from | Q to | Method |
|------------------|-------|---------|--------|------|-----------------------|
| pfam hmm trypsin | 132.0 | 4.4e-41 | 479 | 732 | HMM PFAM (プロテアーゼドメイン) |
| pfam hmm CUB | 105.0 | 1.4e-27 | 128 | 233 | HMM PFAM |
| pfam hmm sushi | 45.0 | 1.6e-09 | 297 | 359 | HMM PFAM (CCP ドメイン) |
| pfam hmm EGF | 35.3 | 1.4e-06 | 239 | 271 | HMM PFAM |
| pfam hmm sushi | 21.8 | 0.016 | 407 | 459 | HMM PFAM (CCP ドメイン) |

表2において、「Hit」は検索の結果、書き出された推定されるドメインの名前を示す。「Score」は、この値が高ければ高いほど信頼度が高いことになる。「Expect」はこの値が0に近ければ近いほど信頼度が高いことになる。「Q from」は推定されるドメインの開始位置を示す。「Q to」は推定されるドメインの終了位置を示す。「Method」はHMM PFAMという方法で検索したことを意味する。文献 (Sonnhammer EL, Eddy SR, Birney E, Bateman A, Durbin Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. Nucleic Acids Res 1998 Jan 1;26(1):320-322) およびインターネットアドレス (<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>) 参照のこと。

[実施例7]

C-PLACE1009992の配列を鋳型としてマウスEST配列を検索したところ、図7から10示すようにマウスのカウンターパート遺伝子のほぼ全長の配列を得た。

[実施例8]

C-PLACE1009992蛋白質のドメイン解析を行った。すなわち、cDNAから推定され

たアミノ酸配列（配列番号：2）に関して、blast2.0 (Nucleic Acids Res., 25(17), p3389-3402, 1997) を用いてホモロジー検索を行い、GenBankに登録されている既知のアミノ酸配列またはドメインとの比較検討を行った。結果を表3に示す。

表3

| 開始位置 | 終了位置 | アミノ酸数 | ドメイン | 公知配列との ホモロジー |
|--------|--------|-------|--------------------------------|------------------------------|
| 1(M) | 23(P) | 23AA | シグナル配列 | |
| 33(C) | 125(C) | 93AA | Cys-rich Region | AU067539と93% |
| 128(C) | 235(E) | 108AA | CUB Domain | AW323842と83% |
| 236(I) | 271(C) | 36AA | EGF-like Domain | AW323842と86% |
| 297(C) | 359(C) | 63AA | CCP Domain (Sushi Domain-1) | AA444868と87% |
| 363(C) | 459(C) | 97AA | CCP Domain (Sushi Domain-2) | AI536361と91% |
| 463(C) | 737(K) | 275AA | Thr protease Dom ain | AA199196と90% AL050214と99% |

[実施例9]

プロテアーゼドメインを有するヒト胎盤由来新規cDNAクローンc-PLACE1009992の機能を推定することを目的として、本クローンに相当する遺伝子の発現組織について解析した。

c-PLACE1009992発現解析用ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プライマーとして、センスプライマーTP-S05 (TGTCTGAGGACTGGGAAGTG／配列番号：15) およびアンチセンスプライマーTP-A06 (TGCCATGGCTCTCATGCTGC／配列番号：16) を使用した。ヒトRAPID-SCAN™ GENE EXPRESSION PANELは、24種のヒト臓器のmRNAに由来するcDNAを4種の濃度で96ウェルプレート中に調製したものとしてOriGene Technologies, Inc社製を用いた。DNAポリメラーゼは、KOD Dash (東洋紡績) を用いた。

PCR反応による遺伝子の增幅を以下のように行なった。まず、RAPID-SCANプレートを4°Cから室温に移し静置した。以下の組成の反応溶液（表4）を調製し、氷中で保冷した。

表4

| | 調製容量 (μL) | 終濃度 |
|--|------------------------|--------------|
| 10×PCR緩衝液* | 300 | 1× |
| dNTP (2 mmol/L) ** | 600 | 0.4 mmol/L |
| センスプロライマー (10 pmol/ μL) | 120 | 10 pmol/well |
| アンチセンスプロライマー (10 pmol/ μL) | 120 | 10 pmol/well |
| 精製水 | 1830 | |
| DNA polymerase (2.5 U/ μL) | 30 | 0.25 U/well |
| 総量 | 3000 | |

* : 酶素に添付された試薬を使用した。

** : dATP,dGTP,dCTP,dTTPの等モル混合物：酵素に添付

RAPID-SCANプレートの1ウェルあたり、上記の調製した反応溶液を25 μL ずつ分注し、ミネラルオイルを適量(約25 μL)重層した。プレートをプラスティックカバーシートで被い、15分間静置した。プレートをサーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler MP : 宝酒造) にセットし、以下の運転プログラムで反応させた (98 °C 3 分間を1サイクル→98°C20秒間、60°C20秒間、75°C 3 分間を35サイクル→75 °C10分間を1サイクル)。

次いで、アガロースゲル電気泳動を行った。PCR産物10 μL を1 μL の10X泳動用緩衝液 (宝酒造の制限酵素に添付) と混合し、泳動装置Mupid (コスマバイオ) にセットした1%アガロースゲル (SeaKem GTG agarose : FMC BioProducts : 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のエチジウムプロマイドを含む) にアプライした。100 Vの定電圧で約45分間泳動した。なお、泳動用緩衝液にはトリス-ホウ酸緩衝液 (宝酒造) を用いた。紫外線照射下で泳動像を観察した。

その結果、PCR産物の電気泳動像から、PCR産物は約630bpのDNAとして得られ、これはプライマーの設計から期待される大きさであった。C-PLACE1009992クローニに相当する遺伝子の発現は、「脳、精巣、前立腺」>「心臓、胎盤、肺」>骨格筋の順に多いことが確認された（表5）。なお、PCR産物は、RAPID-SCANプレート中2.5 ngのcDNAを含む濃度系列にのみ観察され、それ以下の濃度系列では得られなかった。

表5

| 組織 | 遺伝子発現 |
|--|-------|
| 脳、精巣、前立腺 | +++ |
| 心臓、胎盤、肺 | ++ |
| 骨格筋 | + |
| 腎臓、脾臓、肝臓、結腸、肺、小腸、胃、唾液腺、甲状腺、副腎、卵巣、子宮、皮膚、白血球、骨髄 胎児脳、胎児肝 | - |

+++：強いバンドが観察された

++：中程度のバンドが観察された

+：弱いバンドが観察された

-：バンドが観察されなかった

[実施例10]

ヒト脳の各組織における本クローニの発現量を検討した。全脳、扁桃体、尾状核、小脳、脳梁、海馬、黒質、視床の各部位のmRNAに由来するcDNAのライブラリー（宝酒造）を用いて、実施例9の方法に準じて実験を行った。結果を表6に示す。

表6

| 組織 | 遺伝子発現 |
|-----------------------|-------|
| 全脳、扁桃体、小脳、脳梁、海馬、黒質、視床 | ++ |
| 尾状核 | + |

++ : 強いバンドが観察された

+ : 弱いバンドが観察された

[実施例 11]

本クローニングの病態への関与を推定することを目的として、ヒトのアルツハイマー病脳組織における発現量を正常組織における発現量と比較検討した。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)用プライマーとして、C-PLACE1009992発現解析用センスプライマーおよびアンチセンスプライマーは、ともに実施例9で設計したものを利用した。

本プライマーセットは、0.63 kbのPCR産物を与える。また、コントロール遺伝子であるヒトglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) の発現解析用には市販のプライマーセット(CLONTECH)を用いた。本プライマーセットは、0.45 kbのPCR産物を与える。脳組織cDNAとして、アルツハイマー患者および正常成人の前頭葉および海馬に由来するcDNAを、BioChain Instituteより購入して用いた。DNAポリメラーゼとして、TaKaRa Ex Taq™（宝酒造）を用いた。

まず、以下の操作によりPCR反応を行った。cDNAの原液をTE溶液(10 mmol/L Tris・HCl、1 mmol/L EDTA、pH 8.0)で1/2倍希釈した後、本操作を順次4回繰り返し、濃度が1倍、1/2倍、(1/2)²倍、(1/2)³倍、(1/2)⁴倍、(1/2)⁵倍の希釈系列を作製した。以下の組成の反応溶液(表7)を15 mL遠心チューブ内に調製し、氷中で保冷した。

表7

| | 1 反応 (μL) | 調製容量** * (μL) | 終濃度 |
|--|---------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 10×PCR緩衝液* | 10 | 250 | 1× |
| dNTP (2.5 mmol/L) ** | 8 | 200 | 0.2 nmol/ μL |
| センスプロライマー (10 pmol/ μL) | 2 | 50 | 0.2 pmol/ μL |
| アンチセンスプロライマー (10 pmol/ μL) | 2 | 50 | 0.2 pmol/ μL |
| 精製水 | 76.5 | 1912.5 | |
| Ex Taq (5 U/ μL) | 0.5 | 12.5 | 0.025 U/ μL |
| 総量 | 99 | 2475 | |

* : 酵素に添付された試薬を使用した。

** : dATP, dGTP, dCTP, dTTPの等モル混合物 : 酵素に添付

*** : 25反応分

200 μL 用PCRチューブにcDNAの希釈液を1 μL 、上記の調製した溶液を99 μL 添加した。

チューブをサーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler MP : 宝酒造) にセットし、以下の運転プログラムで反応させた (94°C2分間を1サイクル→94°C30秒間、60°C 30秒間、72°C2分間を30サイクル→72°C5分間を1サイクル)。

次いで、アガロースゲル電気泳動を以下のように行った。30サイクルで反応を停止して得たPCR産物10 μL を2 μL の5×泳動用緩衝液と混合した後、うち5 μL を泳動装置Mupid (ADVANCE社) にセットした1.5%アガロースゲル (SeaKem GTG agarose : FMC BioProducts) にアプライした。50 Vの定電圧で約60分間泳動した。なお、泳動用緩衝液にはトリス-ホウ酸緩衝液を用いた。ゲルをエチジウムプロマイド溶液 (500 ng/mL) に約1時間浸して染色した後、紫外線照射下で泳動像を観察した。

前頭葉についての結果を表8に、海馬についての結果を表9に示す。

表8

| 希釈倍数 | 正常脳（前頭葉） | 患者脳（前頭葉） |
|------|----------|----------|
| 1 | + | + |
| 1/2 | +/- | + |
| 1/4 | - | +/- |
| 1/8 | - | - |
| 1/16 | - | - |
| 1/64 | - | - |

+: バンドが観察された

+/-: バンドが若干観察された

-: バンドが観察されなかった

前頭葉におけるG3PDH遺伝子の発現量は、正常成人とアルツハイマー患者とで同等であったが、C-PLACE1009992遺伝子の発現量は、患者脳で2倍程度高かった。

表9

| 希釈倍数 | 正常脳（海馬） | 患者脳（海馬） |
|------|---------|---------|
| 1 | ++ | + |
| 1/2 | ++ | + |
| 1/4 | ++ | +/- |
| 1/8 | + | - |
| 1/16 | + | - |
| 1/64 | +/- | - |

++: 強いバンドが観察された

+: バンドが観察された

+/-: バンドが若干観察された

-: バンドが観察されなかった

海馬におけるG3PDH遺伝子の発現量も、正常成人とアルツハイマー患者とで同等であったが、C-PLACE1009992遺伝子の発現量は、正常脳で8倍程度高かった。

C-PLACE1009992遺伝子の発現は、アルツハイマー患者の脳の海馬領域で低下することが示唆された。すなわち、本遺伝子は、正常脳において記憶や学習能に関する可能性が示唆された。また、本発明の遺伝子は、アルツハイマー病の遺伝子治療への応用や診断への適用等も期待できる。

[実施例12] C-PLACE1009992の発現ベクター作製

hC-PLACE1009992のC末端にMycHisタグ配列を融合発現する哺乳動物細胞用発現ベクターを作製するため、以下の操作を行った。

1) hC-PLACE1009992の全長増幅用プライマーペアを作製した。

hC-PLACE1009992の終始コドンを除く全アミノ酸コード領域（配列番号：1の第47番目から第2257番目の塩基まで）の両端にアニーリングするPCRプライマーペア

ATGGAGCTGGTTGCTGGAC／配列番号：17

TTTCATATTCTTCAATCC／配列番号：18

に、N末端側プライマーには4塩基のスペーサーと制限酵素NheIの認識配列、C末端側プライマーには4塩基のスペーサーと制限酵素HindIIIの認識配列を付加したPCRプライマーペア

NHTP-S01： GAAAGCTAGCATGGAGCTGGTTGCTGGAC／配列番号：19

HDTP-A01： GAAAAGCTTTTCAATTTCTTCAATCC／配列番号：20

を設計・合成した。

2) 全長cDNA増幅用プライマーペアでhC-PLACE1009992全長cDNAを増幅した。

NHTP-S01およびHDTP-A01をプライマー、hC-PLACE1009992を含むプラスミドを鋳型として、耐熱性DNAポリメラーゼKOD DNA Polymerase（東洋紡）にて、PCRをおこなったところ、目的のヒト全長cDNAと考えられる約2.2KbpのDNAが主な増幅産物として得られた。なお、PCRの反応液組成はKOD DNA Polymerase添付のプロトコルに従い、温度条件はHDTP-A01のT_mが低いことから、アニーリングのみ穏やかな条件（45°C）にておこなった。

3) MycHisタグ融合発現ベクターに全長cDNAをサブクローニングした。

哺乳動物細胞発現用ベクターpcDNA3.1/Myc-His(-) A(Invitrogen社) および増幅したヒト全長cDNAを、制限酵素NheI(宝酒造)とHindIII(宝酒造)で消化した後、アガロースゲル電気泳動し、それぞれ目的のDNA断片を、QIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN社)を用いて添付プロトコルに従いゲル中から回収した。ゲル中から回収したヒト全長cDNAおよびpcDNA3.1/Myc-His(-) A断片は、Ready-To-Go T4 DNA ligase(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社)を用いて添付プロトコルに従い連結した。連結したプラスミド(ヒト全長cDNAとpcDNA3.1/Myc-His(-) Aの複合体)をDH5 α コンピテント細胞(東洋紡)に導入し、大腸菌形質転換体を得た。得られた大腸菌形質転換体は、終濃度50 μ g/mLのアンビシリソ(ナカライトスク社)を含むTerrific Broth培地で培養し、当該DNAを含むプラスミドをQIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN社)で抽出した。

4) 全塩基配列の決定

抽出したプラスミドの塩基配列決定用サンプルは、プラスミドベクターpcDNA3.1/Myc-His(-) Aから設計・合成したプライマー

pcDNA-S1 : CACTGCTTACTGGCTTATCG / 配列番号 : 2 1

およびhC-PLACE1009992塩基配列から設計・合成したプライマー

TP-S04 : CTTATCAACGGACGCCATGC / 配列番号 : 2 2

TP-S06 : CCTGAAGCTCCTAGACAAGG / 配列番号 : 2 3

TP-A02 : GCACTCTGCACAGTAGAAC / 配列番号 : 2 4

TP-A03 : AAGGTCCAGCCTTGTCAAGG / 配列番号 : 2 5

TP-A04 : CCTTGACTGAACCTGCATCG / 配列番号 : 2 6

TP-A05 : CCAGGTCAGTAACACAGTGG / 配列番号 : 2 7

TP-A06 : TGCCATGGTCCTCATGCTGC / 配列番号 : 2 8

を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems社)にて添付プロトコルに従い調製した。調製したサンプルは、キャビラリー電気泳動式塩基配列解析装置ABI PRISM 310ジェネティックアナライザ

(PE Biosystems社)で解析し、作製したプラスミドの塩基配列を決定した。塩基配列を決定した2クローンのうち、1クローンが目的のhC-PLACE1009992とMycHisタグを融合したアミノ酸コード領域を有するプラスミドであった。

作製したhC-PLACE1009992のC末端にMycHisタグ配列を融合発現するベクターをpcDNA3.1(-)/C-PLACE1009992/MycHisと命名した。アミノ酸コード領域の塩基配列は配列番号：5に、それより発現される推定アミノ酸配列は配列番号：6に示す。

[実施例 13] 昆虫細胞でのC-PLACE1009992遺伝子発現

1) 組換えバキュロウイルスベクターの作製

C-PLACE1009992遺伝子動物細胞発現用ベクター、pcDNA3.1(-)/C-PLACE1009992/MycHisを制限酵素Nhe I（宝酒造製、Code No.1162A）およびAfl II（宝酒造製、Code No.1003A）で切断後、「DNA Blunting Kit」（宝酒造製Code No.6025）で切断末端を平滑化した。反応終了後のDNAサンプルをアガロースゲル電気泳動に供し、C-PLACE1009992/MycHis断片である約2.2 KbのDNA断片をアガロースゲルより分離精製した。次に市販のクローニング用ベクターであるpENTTM1A (GIBCO BRL社製、Code No.11813-011) を制限酵素Dra I（宝酒造製、Code No.1037A）およびEco RV（宝酒造製、Code No.1042A）で切断後、セルフライゲーションを防止するためにアルカリフィオスファターゼ（宝酒造製、Code No.2120A）を添加し、60°Cで30分間反応させて、末端の脱リン酸化を行った。反応終了後、アガロースゲル電気泳動により、ベクター断片である約2 KbのDNA断片をゲルから分離、精製した。両DNA断片をモル比で約1：3（=ベクター：挿入断片）となるように混合し、「DNA Ligation Kit」（宝酒造製、Code No.6021）でライゲーション後、大腸菌コンピテントセルDH5 α （宝酒造製、Code No.9057）を形質転換した。形質転換した大腸菌を、カナマイシン（最終濃度50 mg/L）を含むLBプレートに塗布し、37°Cで一夜培養した。出現したコロニーを任意に数個選択し、約2 mLのLB液体培地（50 mg/Lのカナマイシンを含む）に接種後、37°Cで一夜培養した菌体から、市販の「Q

「QIAprep Spin Miniprep Kit」(QIAGEN社製、Code No.27106)によりそれぞれのプラスミドDNAを抽出精製した。各プラスミドDNAを制限酵素Psh BIあるいはNhe IおよびHind IIIで切断した消化パターンをアガロースゲル電気泳動により解析して目的のプラスミドを選択し、得られたプラスミドをpENTR1A/C-PLACE1009992/MycHisと命名した(図3)。

次に、「Baculovirus Expression System」(GIBCO BRL社製、Code No.11827-011)を用いて試験管内組換え反応を行い、pENTR1A/C-PLACE1009992/MycHisにサブクローニングされているC-PLACE1009992/MycHis遺伝子をバキュロウイルス用トランスファープラスミドであるpDESTTM8にクローニングした。「Baculovirus Expression System」の添付プロトコールに従い、pDESTTM8とpENTR1A/C-PLACE1009992/MycHisの試験管内組換え反応を行った後、大腸菌コンピテントセルDH5 α (宝酒造製、Code No.9057)を形質転換した。形質転換した大腸菌を、アンビシリン(最終濃度50 mg/L)を含むLBプレートに塗布し、37°Cで一夜培養した。出現したコロニーを任意に数個選択し、0.1 mLのLB液体培地(50 mg/Lアンビシリンを含む)に懸濁し、そのうちの1 μ Lを鋳型としてコロニーPCR反応を行った。プライマーはC-PLACE1009992遺伝子内を増幅する2種のプライマー(TP-S05, TP-A06; 配列は前述)を用い、市販の増幅酵素KOD Dash(東洋紡社製、Code No.)により98°C3分間を1サイクル→98°C20秒間、60°C20秒間、75°C2.5分間を35サイクル→75°C10分間を1サイクルの条件下でPCR反応を行い、アガロースゲル電気泳動により630 bpのDNA増幅バンドが検出されたクローンを選択した。さらに選択したクローンを約2 mLのLB液体培地(50 mg/Lのアンビシリンを含む)に接種後、37°Cで一夜培養した菌体から、市販の「QIAprep Spin Miniprep Kit」(QIAGEN社製、Code No.27106)によりそれぞれのプラスミドDNAを抽出精製し、前述のシーケンスプライマーを用いてC-PLACE1009992遺伝子の塩基配列を確認した。得られた目的のトランスファープラスミドをpDEST8/C-PLACE1009992/MycHisと命名した(図4)。

前項で作製したトランスファーブラスミドpDEST8/C-PLACE1009992/MycHisとバキュロウイルスDNAとを組換えてC-PLACE1009992/MycHis遺伝子発現ウイルスを作製するため、Bacmidを組込んだ市販の大腸菌コンピテントセル「MAX EFFICIENCY DH10BAC Competent Cells」(GIBCO BRL社製、Code No.10361-012)をpDEST8/C-PLACE1009992/MycHisで形質転換した。形質転換後の大腸菌を、LB培地(50 mg/Lのカナマイシン、10 mg/Lのテトラサイクリン、7 mg/Lのゲンタマイシン、100 mg/LのX-gal、40 mg/LのIPTGを含む)に塗布し、37°Cで一夜培養した。出現したコロニーから白色のクローンを選択し、50 mLのLB液体培地(50 mg/Lのカナマイシン、10 mg/Lのテトラサイクリン、7 mg/Lのゲンタマイシンを含む)で37°Cで一夜培養後、市販の「CONCERT High Purity Maxiprep System」(GIBCO BRL社製、Code No.11452-018)により組換えBacmid DNAを精製した。得られた組換えBacmid DNAを、Bacmid/C-PLACE1009992/MycHisとして2クローンを選択し(Clone No.8、Clone No.10)、昆虫細胞トランスフェクション用のDNAとした。

2)組換えバキュロウイルスペクターによるC-PLACE1009992/MycHis蛋白の発現
前項で取得したBacmid/C-PLACE1009992/MycHis(Clone No.8およびClone No.10)DNAを市販の「CELLFECTIN Reagent」(GIBCO BRL社製、Code No.10362-010)を用いて昆虫細胞Sf9細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの方法は、「CELLFECTIN Reagent」に添付の標準プロトコールに従って行い、トランスフェクション後3日目に培養上清液を組換えウイルス液(約2 mL)として採取した。さらにウイルス液を増幅するため、50 mL容培養フラスコ(FLASK50、住友ペークライト社製、Code No.MS-20050)に 3.0×10^6 数のSf9細胞を付着させ、培地を吸引除去したのち、前記のウイルス液0.5 mLを添加した。室温で1時間放置した後、5 mLの培地(Sf-900 II Serum-Free Medium、GIBCO BRL社製、Code No.10902-096)を添加し、28°Cで4日間培養した。培養終了後、上清液(約5 mL)を採取し、遠心分離(3000 rpm、5分間、室温、KUBOTA5200)により細胞を除去した液を「組換えウイルス液」として4°Cに保存した。

作製した組換えバキュロウイルスによるC-PLACE1009992/MycHis蛋白の発現を検討するため、以下の実験を行った。まず 6 Well Tissue Culture Plate ($\phi 35\text{mm}$) (マルチプレート6F、住友ペークライト社製、Code.No.MS-80060) に、1 Wellあたり 1.0×10^6 数のSf9細胞を付着させ、培地を吸引除去したのち、前記の「組換えウイルス液」0.3 mLを感染させた。室温で1時間放置した後、2 mLの培地 (Sf-900 II Serum-Free Medium、GIBCO BRL社製、Code No.10902-096) を添加し、28°Cで培養した。培養開始後、2日目、3日目にプレートを取り出し、CELL LIFTER (Costar社製、Code.No.3008) を用いて付着した細胞をすべてかきとて遠心管に回収し(約2 mL)、遠心分離(3000rpm、5分間、室温、KUBOTA5200)により細胞と培養上清液(約2 mL)を分離した。沈殿した細胞は0.2 mLのTE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH=8.0, 1 mM EDTA) に再懸濁した。

次に、培養上清液および細胞懸濁液中のC-PLACE1009992/MycHis蛋白を検出するため、His-Tag抗体によるウェスタンプロッティング解析を行った。前項で調製した培養上清液 (Extracellular) および細胞懸濁液 (Intracellular) それぞれ0.1 mLに対し、等量 (0.1 mL) のSDS Sample Buffer (Tris-SDS-BME Sample Loading Buffer、第一化学薬品社製、Code.No. ER33) を添加し、100°Cで5分間加熱した。各サンプル0.2mLのうち10 μLをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供した。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動は、市販の「マルチゲル4/20」(第一化学薬品社製、Code.No. 211010)を「カセット電気泳動槽「第一」DPE-120、Code.No. 130472」にセットし、泳動条件は添付の標準プロトコールに従って行った。泳動Bufferは、宝酒造製「Tris - Glycine - SDS Powder、Code.No.T901」を用い、分子量マーカーは、BIO-RAD社製「Prestained SDS-PAGE Standards、Low Range (Code.No.161-0305、Control; 86580)、High Range (Code.No.161-0309、Control; 86878)」を用いた。泳動終了後、「プロッティング・システム」(TAITEC社製、Code.No.TM-6)を用いてElectro TransferによりPVDFメンブレン (TEFCO社製、Code.No.03-056) にプロッティングした。Electro Transferは、宝酒造製「Tr

is - Glycine Powder、Code.No.T902」にメタノールを20%添加した溶液中で、150mA定電流で1.5時間行った。プロッティングしたPVDF膜は、Invitrogen社製の「Anti-His(C-term)Antibody、Code.No.R930-25」を用い、添付されていた標準プロトコールに従って抗体反応を行った。抗体にラベルされたPeroxidaseの検出には、Amersham LIFE SCIENCE社製「ECL+Plus、Code.No.RPN2132」を用い、添付されていた標準プロトコールに従って行った。

抗His-Tag抗体によるC-PLACE1009992/MycHis蛋白のウェスタン解析の結果、No.8、No.10両クローンとも、組換えウイルス感染後3日目の細胞画分において、約82 kDaの分子量の位置に明瞭なバンドが検出された。この分子量はC-PLACE1009992/MycHis蛋白において予想されるものと一致した。このような結果から、昆虫細胞発現系においてC-PLACE1009992/MycHis蛋白が発現していることが確認された。

[実施例14] C-PLACE1009992のマウスカウンターパートcDNA取得

ヒト新規cDNAであるC-PLACE1009992のマウスカウンターパートを取得することを目的として、以下の操作を行った。

1) hC-PLACE1009992を用いてマウスカウンターパートのEST配列を検索し、mC-PLACE1009992の全長cDNA增幅用プライマーペアを作製した。

hC-PLACE1009992アミノ酸配列（配列番号：2）をクエリーとして公共D Bを検索しヒットしたマウスESTのうち、アミノ酸コード領域の5'末端付近にヒットしたAU067539および3'末端付近にヒットしたAA199196の塩基配列から、マウス全アミノ酸配列をコードするcDNAを増幅する目的で、PCRプライマーペア

mTP-S01 : TCACTCGGTACCGACACAGC／配列番号：29

mTP-A01 : ATGTACAGACGGATGCTAGG／配列番号：30

を設計・合成した。

2) 全長cDNA增幅用プライマーペアとマウス由来cDNAソースを用いてPCRでmC-PLACE1009992全長cDNAを増幅した。

mTP-S01およびmTP-A01を用い、マウス精巣由来Quick Clone cDNA (Clontech社

) を鋳型として、耐熱性DNAポリメラーゼKOD-PLUS(東洋紡)にて、KOD-PLUSの添付プロトコルに従いPCRを行ったところ、目的のマウスcDNAと考えられる約2.3KbpのDNAが主な増幅産物として得られた。

3) 全長cDNAのクローニング

増幅されたDNA溶液をアガロースゲルで電気泳動し、QIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN社)を用いて添付プロトコルに従い、約2.3KbpのDNAを回収した。回収したDNAをZero BluntTM TOPOTM PCR Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて添付プロトコルに従い、キット添付のプラスミドベクターpCR[®]-BluntII-TOPOに連結した後、キット添付のTOP10コンピテント細胞に導入し、大腸菌形質転換体を得た。得られた大腸菌形質転換体を、終濃度25 μg/mLの硫酸カナマイシン(ナカライトスク社)を含むTerrific Broth培地で培養し、当該DNAを含むプラスミドをQIA prep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN社)で抽出した。

4) 全塩基配列の決定

抽出したプラスミドに含まれる当該DNAの塩基配列決定用サンプルは、プラスミドベクターpCR[®]-BluntII-TOPOにアニーリングするプライマー

SP6Primer : CTATTTAGGTGACACTATAG／配列番号：3 1

T7Primer : GTAATACGACTCACTATAGGGC／配列番号：3 2

とhC-PLACE1009992にヒットした公共DB上のマウスEST (AU067539, AW323842, AA444868, AI536361, AA833210, AA199196) から設計・合成したプライマー

mTP-S01, mTP-A01はともに前記と同じもの、

mTP-S03 : GATTCTACTGCCAGAGTGC／配列番号：3 3

mTP-S04 : GTCTTGAGGAGATCACAGC／配列番号：3 4

mTP-S05 : CAGAATGGAGAGTGGTCAGG／配列番号：3 5

mTP-S06 : TCTCCAAAGACCCAAGGCAC／配列番号：3 6

mTP-S07 : GGTTTCTGCTATCATTCTGC／配列番号：3 7

mTP-S08 : ATCTGCACTGCAGAGACAGG／配列番号：3 8

mTP-A03 : CATGCAGTCTCCTCCGTACC／配列番号：39
mTP-A04 : GAAACAAAGGGATGAGGAGC／配列番号：40
mTP-A05 : GGACTCTCCTTCTCACCAAGG／配列番号：41
mTP-A06 : CATCGTGTACACCACTGGTC／配列番号：42
mTP-A07 : TCTGGATGCTTTCTCATCC／配列番号：43
mTP-A08 : CATGGTCTTCATGCTGTTCC／配列番号：44

を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems社)にて添付プロトコルに従い調製した。調製したサンプルは、キャビラリー電気泳動式塩基配列解析装置ABI PRISM® 310ジェネティックアナライザ(PE Biosystems社)で解析し、当該DNAの塩基配列を決定した。得られたmC-PLACE1009992のcDNA塩基配列は配列番号：3に、それより推定されたアミノ酸配列は配列番号：4に示す。

ヒト由来のものとマウス由来のものを比較すると、その相同性はアミノ酸配列レベルで約90%であった(図5、6)。

産業上の利用の可能性

本発明のcDNAは全長であるため、翻訳開始点を含み、蛋白質の機能解析において有用な情報を与えるものである。本発明により、新規なセリンプロテアーゼ様蛋白質(C-PLACE1009992)、当該蛋白質をコードする遺伝子、当該遺伝子を含むベクター、当該ベクターを含む形質転換体、当該蛋白質の製造方法が提供された。本発明のcDNAはアルツハイマーに関連していることが示唆される。このため、本発明の遺伝子あるいは蛋白質は、特に、アルツハイマー病に関連して、診断マーカー、発現や活性を制御する医薬品の開発、あるいは遺伝子治療のターゲットになるなど医薬品の開発等に有効である。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のDNA。
 - (a) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。
 - (b) 配列番号：1または3に記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。
 - (c) 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。
 - (d) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。
2. 配列番号：2または4に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA。
3. 請求項1または2に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド。
4. 請求項1または2に記載のDNAが挿入されたベクター。
5. 請求項1または2に記載のDNAまたは請求項4に記載のベクターを保持する形質転換体。
6. 請求項5に記載の形質転換体を用いて蛋白質またはペプチドを発現させる工程、および発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、請求項3に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。
7. 請求項3に記載の蛋白質またはペプチドに結合する抗体。
8. 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。
9. 請求項3に記載の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法であって

- (a) 該蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、
- (b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程

- (c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 請求項1若しくは2に記載のDNA、請求項3に記載の蛋白質若しくはペプチド、または請求項4に記載のベクターを含有する医薬組成物。

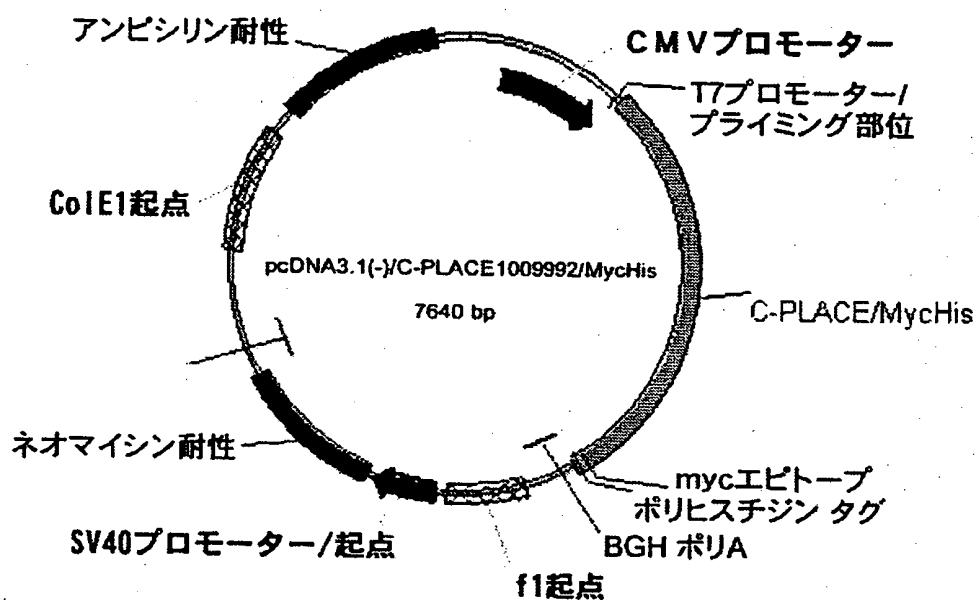
1 / 1 0

☒ 1

| | |
|---------|---|
| zymo1 | : factor C-endotoxin-sensitive intracellular serine protease zymogen (S77064) |
| Clocc | : LIMULUS CLOTTING FACTOR C (P28175) |
| MASP2 | : COMPLEMENT-ACTIVATING COMPONENT OF RA-REACTIVE FACTOR (P48740) |
| Chymo | : Chymotrypsin |
| Chymase | : Chymase |
| Elast | : Elastase |
| @ | |
| Query: | ITAP-KTQGLRWPWQAAIYRRRTSGVHDGSLHKGAWFLVCSGALVNERTVVVAHCVTD |
| Zymo1: | SPFIWNGNSTEIGQWPWQAGISRWLA-----DHNMFILQCGGSLLNEKWIVTAAHCVY |
| MASP2: | MARIFNGRPQAQKGTTPWIAMLS-----HLNGQPFCCGSLLGSSWIVTAAHCLHQ |
| Chymo: | LSRIVNGEADAVPGSWPWQV-----SLQDKTGFHFCGGSLISEDWVVTAAHCGR |
| Chyma: | IIGGTECKPHSRPYMAYLEIVT-----SNGPSKFCCGFLIRRNFVLTAAHCAGR |
| Throm: | IVEGSDAEIGMSPWQVMLFRK-----SPQELLCGASLISDRWLTAAHCLLY |
| Elast: | ---VVGGEEARPNNSWPWQVSLQ-----YSSNGKwyHTCGGSLIANSWVLTAAHCIS |
| @ | |
| Query: | -----LGKVTMKIKTADLKVVVLGKFYRDDDRDEK---TIOSLQISAIILHPN 1750 |
| Zymo1: | -----SATAEIIDPNQFKMYLGKYYRDDSRDD---YVQVREALEIHVNPN 856 |
| MASP2: | SLDPKDPTLRDSDLSPDFKIILGKHWRRLRSDENE-----QHLGVKHTTLHPK 543 |
| Chymo: | TSD-----VVVAGEFDQGSDEENIQVLKIAK-----VFKNPKFSILTWN |
| Chyma: | SIT-----VTLGAHNITEEDTWQKLEVIKQ-----FRHPKYNTSTLIAL |
| Throm: | PPWDKNF---TENDLLVR-IGKHSRTRYERNIEKISM---LEKIYIHP---RYN |
| Elast: | -----SRTYRVG-----LGRHNLYVAESGS-LAVSVSKIVVHKDWNSN |
| @ | |
| Query: | YDPILLDADIAILKLLDKARISTRVPQICLAAZR-DLSTSfqESHI-TVAGWNVLAD-V-RSP-- 1927 |
| Zymo1: | YDPGNLNFDIALIQLKTPVTLTRVQPICLPTDI-TTREHLKEGTAVVTGWG-----LNEN 912 |
| MASP2: | YDPNTFENDVALVELLESPVNLNAFVMPICLPE-----GPQQEGAMIVVSGWGKQFL-Q-RFPET 600 |
| Chymo: | -----NDITLLKLATPARFSQTSQVSACVCLPSAD---DDFPAGTLCATTGWGKTKYNANKTPDK |
| Chyma: | ---MKLHHDIMLLKLKEASLTAVGTLPPSQF---NFVPPGRMCRVAGWGRGTV-LKPGSDT |
| Throm: | WR-ENLDRDKKPVAFS-----DYIHPVCLPDRE-TAASLLQAGYKGRVTGWGNLKETWTANVGKG |
| Elast: | -Q-ISKGNDIALLKLANPVSLTDKIQLACLPP---AGTILPNNNYPCYVTGWGR----- |
| + @ | |
| Query: | GFKNDTLRS---GVSVVDSLLCEEQHEDHGIPVSVDNMF-CASWEPTAPS--DICTAETGGIAA |
| Zymo1: | NTYSETIQQ---AVLPVVAASTCEEGYKEADLPLTVTEMNF-CAGYK-KGRY--DACSGDSGG--P |
| MASP2: | ---LMEIE----IPIVDHSTCQKAYAP--LKKKVTRDM-ICAG-EKEGGK--DACSGDSGGPMV |
| Chymo: | ---LQQAA----LPLLNSNAECKKSWG----RRITDVM-ICAG---ASGV--SSCMGDGGPLV |
| Chyma: | ---LQEVK----LRLMDPQACSHFRDF----DHNLQ-LCVG-NPRKTK--SAFKGDGGPLL |
| Throm: | QPSVLQVNV----LPIVERPVCKDSTRI----RITDMF-FCAGYKPDEGKRGDACEGDSGGPFV |
| Elast: | QTNGAVPDVLQQGRLLVVVDYATCS--SSAWW-GSSVKTSM-ICAGGDGV-----SSCNGDGGPLN |
| + | |
| Query: | VSFPGRASPEPRWLMGLVWSWSYDKTCMH-RLSTAFTKVLPFKDWIER |
| Zymo1: | LVFADDSTERRWVLEGIVSWGSPSGCGKANQYGGFTKVNVFLSWIRO |
| MASP2: | T---LNRERGQWYLVGTWSWGD--DCGKKDRYGVYSYIHHNKDWIQR |
| Chymo: | ---CQ-KDGAWTLVGIWSWGS--DTCSTSSPGVYARVTKLIPWVQKILAAN |
| Chyma: | ---CAG----VAQGIVSYGRS-DAKPP--AVFTRISHYRPWINOILQAN |
| Throm: | ---MKSPFNNRWWOMGIVSWGE--GCDRDKYGFYTHVFRLLKKWIQKVIDQFGE |
| Elast: | ---CQASDGRWQVHGIVSFGSRLGCNYYHKPSVFTRVSNYIDWINSVIANN |

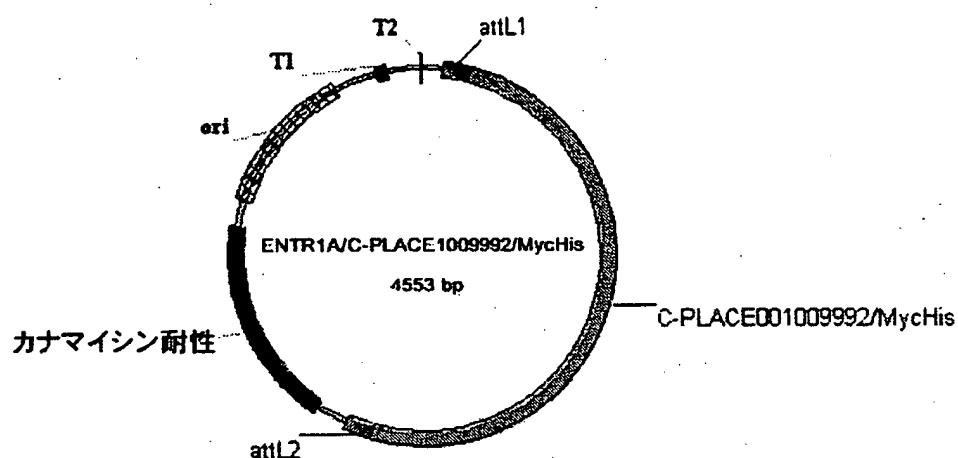
2 / 10

図 2



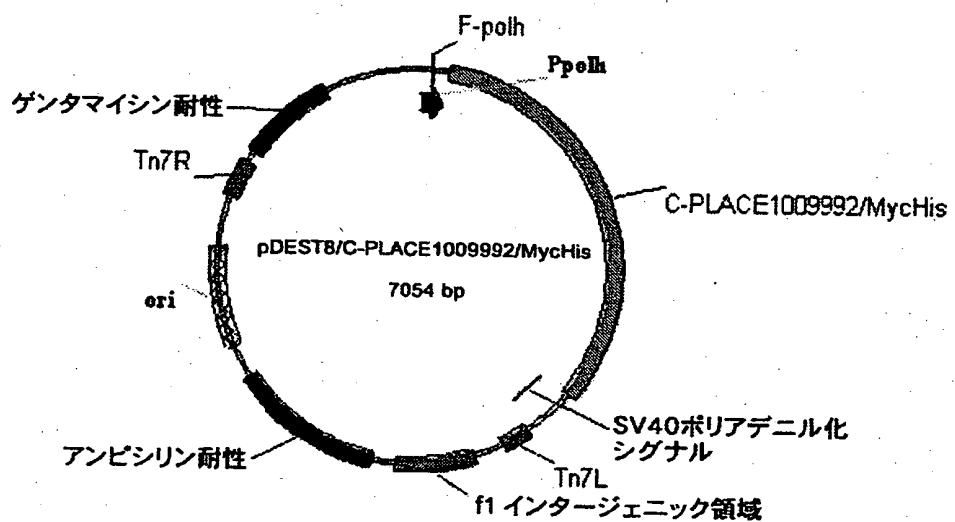
3 / 10

図 3



4 / 10

図4



5 / 10

図 5

| | | | | | | |
|-----------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| >上段：ヒト | | | | | | |
| >下段：マウス | | | | | | |
| 相同性（一致するアミノ酸の数/全体のアミノ酸*100）= 90 % | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | |
| AA mC-PLACE1 | 1 MELGCWTQLG LTFLQLLLIS SLPREYTVIN EACPGAEWNI MCRECCYEYDQ | | | | | 50 |
| AA C-PLACE10 | 1 MELDRWAQLG LVFLQLLLIS SLPREYTVIN EACPGAEWNI MCRECCYEYDQ | | | | | 50 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | |
| AA mC-PLACE1 | 51 IECVCPGKRE VVGYTIPCCR NEENECDSCL IHPGCTIFEN CKSCRNGSWG | | | | | 100 |
| AA C-PLACE10 | 51 IECLCPGKKE VVGYTIPCCR NEDNECDSCL IHPGCTIFEN CKSCRNGSWG | | | | | 100 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | |
| AA mC-PLACE1 | 101 GTLDDFYVKG FYCAECRAGW YGGDCMRCGQ VLRAPKGQIL LESYPLNAHC | | | | | 150 |
| AA C-PLACE10 | 101 GTLDDFYVKG FYCAECRAGW YGGDCMRCGQ VLASKGQIL LESYPLNAHC | | | | | 150 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | |
| AA mC-PLACE1 | 151 EWTIHAKPGF VIQLRFVMLS LEFDYMCQYD YVEVRDGDNR DGQIIKRVCVG | | | | | 200 |
| AA C-PLACE10 | 151 EWTIHARPGF IIQLRGMLS LEFDYMCQYD YVEVRDGDNS DSPIIKRFCG | | | | | 200 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | |
| AA mC-PLACE1 | 201 NERPAPIQSI GSSLHVLFLHS DGSKNFDGFH AIYEEITACS SSPCFHDGTC | | | | | 250 |
| AA C-PLACE10 | 201 NERPAPIRST GSSLHVLFLHS DGSKNFDGFH AVFEEITACS SSPCFHDGTC | | | | | 250 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | |
| AA mC-PLACE1 | 251 VLDKAGPYKC ACLAGYTGQR CENLLEAGKS KIKASEDSL S VLEERNCSDP | | | | | 300 |
| AA C-PLACE10 | 251 LLDTTGSFKC ACLAGYTGQR CENLLE----- ERNCSDL | | | | | 300 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | |
| AA mC-PLACE1 | 301 GGPVNGYKKI TGGPGLINGR HAKIGTVVS F CNNSYVLSG NEKRTCQQNG | | | | | 350 |
| AA C-PLACE10 | 301 GGPVNGYKKI TEGPGLLNEH HVKIGTVVS F CNNSYVLSG NEKRTCQQNG | | | | | 350 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 | |
| AA mC-PLACE1 | 351 EWSGKQPICI KACREP KISD LVRRRVLPMQ VQSRETPLHQ LYSAAFSKQK | | | | | 400 |
| AA C-PLACE10 | 351 EWSGKQPVCM KACREP KISD LVRRRVLSMQ VQSRETPLHQ LYTAFSKQK | | | | | 400 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | |
| AA mC-PLACE1 | 401 LQSAPTKKP A LPFGDLPMPY QHLHTQLQYE CISPFYRRLG SSRRTCLRTG | | | | | 450 |
| AA C-PLACE10 | 401 LDASTKKP A LPFGDLPMPY QHLHTQVQYE CISPFYRRLG SSRRTCLRTG | | | | | 450 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | |
| AA mC-PLACE1 | 451 KWGRAPSCI PICGKIENT APKTQGLRWP WQAAIYRRTS GVHDGSLHKG | | | | | 500 |
| AA C-PLACE10 | 451 KWGRAPSCI PICGKIESTP SPKTQGTRWP WQAAIYRRTS GVHDGGLHKG | | | | | 500 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 510 | 520 | 530 | 540 | 550 | |
| AA mC-PLACE1 | 501 AWFLVCSGAL VNERTVVVA HCVTDLGKV MIKTADLKVV LGKFYRDDR | | | | | 550 |
| AA C-PLACE10 | 501 AWFLVCSGAL VNERTVVVA HCVTELKGAT IIKTADLKVV LGKFYRDDR | | | | | 550 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |
| AA C-PLACE10 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 | |
| AA mC-PLACE1 | 551 DEKTIQSLQI SAIILHPNYD PIILLADIAI LKLLDKARIS TRVQPICLAA | | | | | 600 |
| AA C-PLACE10 | 551 DEKSIQNLRV SAIILHPNYD PIILLDTIAV LKLLDKARIS TRVQPICLAT | | | | | 600 |
| AA mC-PLACE1 | | | | | | |

6 / 1 0

☒ 6

| | 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | |
|--------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| AA C-PLACE10 | 601 SRDLSTSFQE SHITVAGWNV LADVRSPGFK NDTLRSGVVS VVDSLCEEQ | | | | | 650 |
| AA mC-PLACE1 | 601 TRDLSTSFQE SHITVAGWNI LADVRSPGFK NDTLHYGNVR VVDPMLEEQ | | | | | 650 |
| | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 | |
| AA C-PLACE10 | 651 HEDHGIPVSV TDNMFCASWE PTAPSDICTA ETGGIAAVSF PGRASPEPRW | | | | | 700 |
| AA mC-PLACE1 | 651 HEDHGIPVSV TDNMFCASKD PSTPSDICTA ETGGIAALSF PGRASPEPRW | | | | | 700 |
| | 710 | 720 | 730 | 740 | 750 | |
| AA C-PLACE10 | 701 HLMGLVWSY DKTCSHRLST AFTKVLPPKD WIERNMK*..... | | | | | 750 |
| AA mC-PLACE1 | 701 HLVGLVWSY DKTCSNGLST AFTKVLPPKD WIERNMK*..... | | | | | 750 |

7 / 10

☒ 7

| | | |
|--------------|---|---|
| AU067539 | : | AGCTTGGGGAGG |
| AU067539 | : | TCCCGGCAAGAGCAGAGCCGCTGCCCTGTTCTGCCTAGGCATCCCTCCA |
| | | Met |
| PLACE1009992 | : | AAAAAAAAAAAAAAAGTAGACGCTCGGGCACCCGGCAAGGATG |
| AU067539 | : | CAGTCACTCCCTCCAGTCACCGTACCGAACAGCAACGGAAACGATG |
| | | GluLeuGlyCysTrpThrGlnLeuGlyLeuThrPheLeuGlnLeuLeuLeu |
| PLACE1009992 | : | GAGCTGGGTTCTGGACGCAGTGGGGCTCACTTTCTTCAGCTCCTCTC |
| AU067539 | : | GAGCTAGACAGATGGGCGCAGTTGGGCTGGTGTCTGCAGCTCCTCTC |
| | | IleSerSerLeuProArgGluTyrThrValIleAsnGluAlaCysProGly |
| PLACE1009992 | : | ATCTCGTCCTTGCCAAGAGAGTACACAGTCATTAATGAAGCCTGCCCTGGA |
| AU067539 | : | ATCTCATCGTTGCCAAGAGAGTACACGGTCATTAATGAAGCCTGTCCCGGA |
| | | AlaGluTrpAsnIleMetCysArgGluCysCysGluTyrAspGlnIleGlu |
| PLACE1009992 | : | GCAGAGTGGAAATATCATGTGTCGGGAGTCGTGAATATGATCAGATTGAG |
| AU067539 | : | GCTGAGTGGAACATCATGTGTTGAGAATGTTGAATATGATCAGATTGAA |
| | | CysValCysProGlyLysArgGluValValGlyTyrThrIleProCysCys |
| PLACE1009992 | : | TGCGTCTGCCCGGAAAGAGGGAAAGTCGTGGGTTACCATCCCTGCTGC |
| AU067539 | : | TGCCCTGCCCCAGGAAAGAAGGAAGTGGTGGGTTACACCATCCCATGCTGC |
| | | ArgAsnGluGluAsnGluCysAspSerCysLeuIleHisProGlyCysThr |
| PLACE1009992 | : | AGGAATGAGGAGAAATGAGTGACTCCTGCTGATCCACCCAGGTTGTACC |
| AU067539 | : | AGGAATGAGGATAATGAATGTGACTCCTGCTAATTCAACCAGGTTGTACC |
| | | IlePheGluAsnCysLysSerCysArgAsnGlySerTrpGlyGlyThrLeu |
| PLACE1009992 | : | ATCTTGAAACTGCAAGAGCTGCCAAATGGCTCATGGGGGGTACCTTG |
| AU067539 | : | ATCTTGAAACTGCAAGAGCTGCCCAATGGCTCTGGGCGGAACCTG |
| | | AspAspPheTyrValLysGlyPheTyrCysAlaGluCysArgAlaGlyTrp |
| PLACE1009992 | : | GATGACTTCTATGTGAAGGGGTTCTACTGTGCAAGGTGCGCAGGCTGG |
| AU067539 | : | GATGACTTCTACGTGAAGGGATTCTACTGCGCAGAGTGCAGGCAAGCTGG |
| | | TyrGlyGlyAspCysMetArgCysGlyGlnValLeuArgAlaProLysGly |
| PLACE1009992 | : | TACGGAGGAGACTGCATGCGATGTGCCA-GGTTCTGCCAGGCCAAAGGG |
| AU067539 | : | TACGGAGGAGACTGCATGCGATGTGCCAAGGTCTTCGAGCCTCAAAGGG |
| | | GlnIleLeuGluSerTyrProLeuAsnAlaHisCysGluTrpThrIle |
| PLACE1009992 | : | TCAGATTTGTTGGAAAGCTATCCCTAAATGCTCACTGTGAATGGACATT |
| AU067539 | : | TCAGATTTGTTGGAGAGCTATCCCTAAACGCTCACTGTGAATGGACAT |
| | | HisAlaLysProGlyPheValIleGlnLeuArgPheValMetLeuSerLeu |
| PLACE1009992 | : | CATGCTAACCTGGGTTGTCACTCCAACTAAGATTGTCATGTTGAGCCTG |
| AU067539 | : | TCATGCCAACCTGGGTTATCATCCANTTGANGTTGGTATGCTGAACCTA |
| AW323842 | : | AGCCTA |
| | | GluPheAspTyrMetCysGlnTyrAspTyrValGluValArgAspGlyAsp |
| PLACE1009992 | : | GAGTTGACTACATGTGCCAGTATGACTATGTTGAGGTTGTGATGGAGAC |
| AU067539 | : | NAGTTGACTACATGTGCCNATATGACTATGTTGAGGTTGTGAGGTCNNATGGGAT |
| AW323842 | : | GAGTTGACTACATGTGCCAATATGACTACGTGGAGGTCGGCGATGGGAT |

8 / 10

图 8

| | |
|--------------|--|
| PLACE1009992 | : AsnArg AspGlyGlnIleIleLysArgValCysGlyAsnGluArgProAla |
| AU067539 | : AACCGC-GATGCCAGATCATCAAGCGTGTCTGGCAACGAGCGGCCAGCT |
| AW323842 | : AATANTTGACAGCCCTATCATCAAANGTTCTGTGGCAAC-AAGAGGCAACT |
| AA444868 | : AATAGT-GACAGCCCTATCATCAAGCGTTCTGTGGCAACGAGAGGCCAGCT ATCAAGCGTTCTGTGGCAACGAGAGGCCAGCT |
| PLACE1009992 | : ProIleGlnSerIleGlySerSerLeuHisValLeuPheHisSerAspGly |
| AU067539 | : CCTATCCAGAGCATAGGATCCTCACTCCACGTCTCTTCCACTCCGATGGC |
| AW323842 | : CCAACAGGAGCAACTGGCTCTCANTCCAAGTCCTTTCC-ATTCTGATGG |
| AA444868 | : CCCATCAGGAGCACTGGCTCTCACTCCATGTCTTTCCATTCTGATGGC CCCATCAGGAGCACTGGCTCTCACTCCATGTCTTTCCATTCTGATGGC |
| PLACE1009992 | : SerLysAsnPheAspGlyPheHisAlaIleTyrGluGluIleThrAlaCysSer |
| AW323842 | : TCCAAGAATTTCGATGGCTTCCACGCTGTCTTGAGGAGATCACAGCGTGCCTCC |
| AA444868 | : TCCAAGAATTTCGATGGCTTCCACGCTGTCTTGAGGAGATCACAGCGTGCCTCC |
| PLACE1009992 | : SerSerProCysPheHisAspGlyThrCysValLeuAspLysAlaGlyProTyr |
| AW323842 | : TCATCCCCTTGTTCCATGACGGCACGTGCGTCTTGACAAGGCTGGACCTTAC |
| AA444868 | : TCATCCCCTTGTTCCATGATGGCACATGCCTCCTTGACACCACTGGGTCTTTC |
| PLACE1009992 | : LysCysAlaCysLeuAlaGlyTyrThrGlyGlnArgCysGluAsnLeuLeuGlu |
| AW323842 | : AAGTGTGCTGCTTGGCAGGCTATACTGGGCAGCGCTGTGAAAATCTTCTGGAG |
| AA444868 | : AAGTGTGCTGCTGCTGGCTACACTGGGCAGCGCTGTGAAAATCTACTTGAA AAGTGTGCTGCTGCTGGCTACACTGGGCAGCGCTGTGAAAATCTACTTGAA |
| PLACE1009992 | : AlaGlyLysSerLysIleLysAlaSerGluAspSerLeuSerValLeuGluGlu |
| AW323842 | : GCTGGGAAAGTCCAAGATCAAGCGCTCAGAAGATTCTTGCTGCTTGAAGAA |
| AA444868 | : -GAA -GAA |
| PLACE1009992 | : ArgAsnCysSerAspProGlyGlyProValAsnGlyTyrGlnLysIleThrGly |
| AW323842 | : AGAAACTGCTCAGACCTGGGGGCCAGTCATGGTACCAGAAAACAGGG |
| AA444868 | : AGAAACTGCTCAGACCTGGGGGCCAGTCATGGTACAAGAAAATCACAGAA |
| AI536361 | : AGAAACTGCTCAGACCTGGGGGCCAGTCATGGTACAAGAAAATCACAGAA GTT |
| PLACE1009992 | : GlyProGlyLeuIleAsnGlyArgHisAlaLysIleGlyThrValValSerPhe |
| AW323842 | : GGCCCTGGCTTATCAACGGACGCCATGCTAAATTGGCACCGTGGTGTCTTC |
| AA444868 | : GGTCTGGACTCTCAATGAGGCCATGTAAAAATTGGCACGGTGTCTTTC |
| AI536361 | : TTGAAGCTTCTAACCCATGAGCCCCAGAGACCTGTGAATGATTGATGGTG |
| PLACE1009992 | : PheCysAsnAsnSerTyrValLeuSerGlyAsnGluLysArgThrCysGlnGln |
| AA444868 | : TTTTGTAAACACTCCTATGTTCTAGTGGCAATGAGAAAAGAACCTGCCAGCAG |
| AI536361 | : TTTTGTAAACGGCTCATCGTCTGAGTGGCAATGAGAAAAGAACCTGCCAGCAG CTGGAAGGGTGGAGTCAGGTATTCTGGGTGCGTGTGACCACTGAAG |
| PLACE1009992 | : AsnGlyGluTrpSerGlyLysGlnProIleCysIleLysAlaCysArgGluPro |
| AA444868 | : ATGGAGAGTGGTCAGGAAAGCACCTGCTGCGATGAAAGCCTGCCGAGAACCA |
| AI536361 | : ATGGAGAGTGGTCAGGAAAGCACCTGCTGCGATGAAAGCCTGCCGAGAAC GTCGGAAAAGCATCACAGCTGGCTATCTGTTCTAGCCTGCCGGAAACCG |

9 / 10

☒ 9

| | |
|--------------|---|
| | LysIleSerAspLeuValArgArgArgValLeuProMetGlnValGlnSerArg |
| PLACE1009992 | : AAGATTTCAGACCTGGTGAGAAGGAGACTTCCCGATGCAGGTTCAAGTCAGG |
| AI536361 | : AAGATCTCAGACCTGGTGAGAAGGAGACTCCTTCGATGCAGGTTCAAGTCAGG |
| | GluThrProLeuHisGlnLeuTyrSerAlaAlaPheSerLysGlnLysLeuGln |
| PLACE1009992 | : GAGACACCATTACACCAAGCTATACTCAGCGCCCTTCAGCAAGCAGAAACTGCAG |
| AI536361 | : GAGACACCATTACATCAGCTTATTCCACGGCTTCAGCAAGCAGAAATTGCAG |
| | SerAlaProThrLysLysProAlaLeuProPheGlyAspLeuProMetGlyTyr |
| PLACE1009992 | : AGTGCCTCTACCAAGAACGCCCTTCCCTTGGAGATCTGCCCATGGGATAC |
| AI536361 | : GATGCCTCTACCAAAAAGCCAGCCCTTCATTTGGAGACCTGCCCTGGATAC |
| | GlnHisLeuHisThrGlnLeuGlnTyrGluCysIleSerProPheTyrArgArg |
| PLACE1009992 | : CAACATCTGCATACCCAGCTCCAGTATGAGTGCATCTCACCCCTACCGCCGC |
| AI536361 | : CAACATCTGCACACCCAAAGTCCAGTATGAGTGCATCTCGCCCTTACCGCCGC |
| | LeuGlySerSerArgArgThrCysLeuArgThrGlyLysTrpSerGlyArg |
| PLACE1009992 | : CTGGGCAGCAGCAGGAGGACATGCTGAGGACTGGGAAGTGGAGTGGCGG |
| AI536361 | : CTGTGAAGCAGCAGGAGGACATGCCTGAGAACTNGNGAAGTGGAGTGGCGG |
| | AlaProSerCysIleProIleCysGlyLysIleGluAsnIleThrAlaPro |
| PLACE1009992 | : GCACCATCCTGCATCCCTATCGCGGAAATTGAGAACATCACTGCTCCA |
| AI536361 | : GCCCCGTCCTGTATCCAATCTGGAAAAATCGAGAGCACTCCTTCTCCA |
| AA833210 | : GCGC-GTCCTGTATCC-AATCTGTGGAAAATCGAGAGCACTCCTTCTCCA |
| | LysThrGlnGlyLeuArgTrpProTrpGlnAlaAlaIleTyrArgArgThr |
| PLACE1009992 | : AAGACCCAAGGGTTGCGCTGGCCGTGGCAGGCACCCATCTACAGGAGGACC |
| AI536361 | : AAGACCCAAGGCACCCGCTGGCCATGGCAGGCACCCATCTACCGGAGGACC |
| AA833210 | : AAGACCCAAGGCACCCGCTGGCCATGGCAGGCAGC-ATCTACCGGAG-ACC |
| | SerGlyValHisAspGlySerLeuHisLysGlyAlaTrpPheLeuValCys |
| PLACE1009992 | : AGCGGGGTGATGACGGCAGCCTACACAAGGGAGCGTGGTCCCTAGTCTGC |
| AI536361 | : AGTGGTGTACACGATGGTGTCTGCACANAGGTGCATG |
| AA833210 | : AGTGGTGTACACGATGGTGTCTGCACAAAGGTGCATGGTCTGGTCTGC |
| | SerGlyAlaLeuValAsnGluArgThrValValValAlaAlaHisCysVal |
| PLACE1009992 | : AGCGGTGCCCTGGTGAATGAGCGCACTGTGGTGGCTGCCACTGTGTT |
| AA833210 | : AGTGGTGCCTGGTGAATGAACGGACTGTGGTGTGGCTGCCACTGTGTT |
| | ThrAspLeuGlyLysValThrMetIleLysThrAlaAspLeuLysValVal |
| PLACE1009992 | : ACTGACCTGGGAAGGTCAACCATGATCAAGACAGCAGACCTGAAAGTTGTT |
| AA833210 | : ACTGAGCTGGGAAGGCCACCATCATCAAGACAGCAGACCTCAAGGTTGTC |
| | LeuGlyLysPheTyrArgAspAspAspArgAspGluLysThrIleGlnSer |
| PLACE1009992 | : TTGGGGAAATTCTACCGGGATGATGACCGGGATGAGAAGACCATCCAGAGC |
| AA833210 | : TTGGGAAATTCTACAGGGACGATCGGGATGAGAAGACCATCCAGAAT |
| | LeuGlnIleSerAlaIleIleLeuHisProAsnTyrAspProIleLeuLeu |
| PLACE1009992 | : CTACAGATTTCTGCTATCATTCTGCATCCCAACTATGACCCCATCCTGCTT |
| AA833210 | : TTACGGGTTCTGCTATCATTCTGCTCCCTGACCTACAAAACAAAAAA |
| | AspAlaAspIleAlaIleLeuLysLeuLeuAspLysAlaArgIleSerThr |
| PLACE1009992 | : GATGCTGACATGCCATCCTGAAGCTCCTAGACAAGGCCGTATCAGCACC |
| AA833210 | : AAAAAAAAAGATAC |

10 / 10

図10

| | |
|-------------------------|---|
| PLACE1009992 : | ArgValGlnProIleCysLeuAlaAlaSerArgAspLeuSerThrSerPhe CGAGTCCAGCCCCATCTGCCTCGCTGCCAGTCGGGATCTCAGCACTTCCTTC |
| PLACE1009992 : | GlnGluSerHisIleThrValAlaGlyTrpAsnValLeuAlaAspValArg CAGGAGTCCCACATCACTGTGGCTGGCTGGAATGTCTGGCACAGCTGAGG |
| PLACE1009992 : | SerProGlyPheLysAsnAspThrLeuArgSerGlyValValSerValVal AGCCCTGGCTTCAAGAACGACACACTGCCTCTGGGTGGTCAGTGTGGTG |
| PLACE1009992 AA199196 : | AspSerLeuLeuCysGluGlnHisGluAspHisGlyIleProValSer GAETCGCTGCTGTGAGGAGCAGCATGAGGACCATGGCATCCCAGTGAGT CAATGCTTGTGAGGAACAGCATGAAGACCATGGCATTCCAGTTAGT |
| PLACE1009992 AA199196 : | ValThrAspAsnMetPheCysAlaSerTrpGluProThrAlaProSerAsp GTCACTGATAACATGTTCTGCCAGCTGGAAACCCACTGCCCTCTGAT GTCACTGACAACATGTTCTGCCAGCAAAGATCCCAGTACCCCTCTGAC |
| PLACE1009992 AA199196 : | IleCysThrAlaGluThrGlyIleAlaAlaValSerPheProGlyArg ATCTGCACTGCAGAGACAGGAGGCATGCCGCTGTGTCCTTCCGGACGA ATCTGCACTGCAGAGACAGGGGGCATGCCGCTGTGTCCTTCCAGGCCGA |
| PLACE1009992 AA199196 : | AlaSerProGluProArgTrpHisLeuMetGlyLeuValSerTrpSerTyr GCATCTCCTGAGCCACGCCGCTGGCATCTGATGGGACTGGTCAGCTGGAGCTAT GCATCCCCGAGCCACGCCGCTGGCATTTGGTGGGCTGGTCAGCTGGAGCTAT |
| PLACE1009992 AA199196 : | AspLysThrCysSerHisArgLeuSerThrAlaPheThrLysValLeuPro GATAAAACATGCCACAGGCTCCACTGCCCTCACCAAGGTGCTGCC GACAAGACATGGCTATCCACAGCCTCACAAAGGTGTTGCCG |
| PLACE1009992 AA199196 : | PheLysAspTrpIleGluArgAsnMetLys*** TTAAAGACTGGATTGAAAGAAATATGAAATGAACCATGCTCATGCACTCC TTCAAGACTGGATTGAGAGAAACATGAAATGAACAGGCCACAAGGCCACT |
| PLACE1009992 AA199196 : | TTGAGAAGTGTCTGTATATCCGCTGTACGTGTGTCATTGCGTGAAGCA GAGAAGCCTTCTAGCATCCGCTGTACATATGTTATAGAACATGC |
| PLACE1009992 AA199196 : | GTGTGGGCTGAAGTGTGATTGGCTGTGAACCTGGCTGCCAGGGCTT GGGCTGAAGTGTATTTGCCACCATCTGGCTACTGAAAGGCTCCG |
| PLACE1009992 AA199196 : | CTGACTTCAGGGACAAAACCTAGTGAAGGGTAGACCTCATTGCTGG TTTCAGGGACTTATCTCAATAGGGTAGACAGAGTTACTTCATCAGGGA |
| PLACE1009992 AA199196 : | TAGGCTGATGCCGCGTCCACTACTAGGACAGCCAATTGAAAGATGCCAGGG ACTGTCCTCTGACTGCTGGGAATCATCTAAAAGATGCCAGGTCTTGC |
| PLACE1009992 : | CTTGCAAGAAGTAAGTTCTCAAAGAAGACCATATACAAAACCTCCAC |
| PLACE1009992 : | TCCACTGACCTGGTGGTCTTCCCAACTTTCACTTACGAATGCCATCAG |
| PLACE1009992 : | CTGACCAGGGAAAGATCTGGGCTTCATGAGGCCCTTTGAGGCTCAAGT |
| PLACE1009992 : | TCTAGAGAGCTGCCGTGGGACAGGCCAGGGCAGCAGAGCTGGGATGTGGT |
| PLACE1009992 : | GCATGCCCTTGTGACATGGCACAGTACAGTCTGGCTCTTCCCTTCC |
| PLACE1009992 : | ATCTCTGTACACATTTAATAAAATAAGGTTGGCTCTGAACTAC |

1/54

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

<120> A novel gene encoding a serine protease-like protein

<130> H1-107PCT4

<140>

<141>

<150> JP 1999-248036

<151> 1999-07-29

<150> JP 1999-300253

<151> 1999-08-27

<150> JP 2000-118776

<151> 2000-01-11

<150> JP 2000-183767

<151> 2000-05-02

<150> US 60/159,590

<151> 1999-10-18

2/54

<150> US 60/183,322

<151> 2000-02-17

<160> 44

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2784

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (47)..(2257)

<400> 1

aaaaaaaaaaa aaaaaagtag acgctcggtc accagccgcg gcaagg atg gag ctg 55

Met Glu Leu

1

ggc tgc tgg acg cag ttg ggg ctc act ttt ctt cag ctc ctt ctc atc 103

Gly Cys Trp Thr Gln Leu Gly Leu Thr Phe Leu Gln Leu Leu Ile

5

10

15

tcg tcc ttg cca aga gag tac aca gtc att aat gaa gcc tgc cct gga 151

3/54

Ser Ser Leu Pro Arg Glu Tyr Thr Val Ile Asn Glu Ala Cys Pro Gly

20

25

30

35

gca gag tgg aat atc atg tgt cgg gag tgc tgt gaa tat gat cag att 199

Ala Glu Trp Asn Ile Met Cys Arg Glu Cys Cys Glu Tyr Asp Gln Ile

40

45

50

gag tgc gtc tgc ccc gga aag agg gaa gtc gtg ggt tat acc atc cct 247

Glu Cys Val Cys Pro Gly Lys Arg Glu Val Val Gly Tyr Thr Ile Pro

55

60

65

tgc tgc agg aat gag gag aat gag tgt gac tcc tgc ctg atc cac cca 295

Cys Cys Arg Asn Glu Glu Asn Glu Cys Asp Ser Cys Leu Ile His Pro

70

75

80

ggg ggt acc atc ttt gaa aac tgc aag agc tgc cga aat ggc tca tgg 343

Gly Cys Thr Ile Phe Glu Asn Cys Lys Ser Cys Arg Asn Gly Ser Trp

85

90

95

ggg ggt acc ttg gat gac ttc tat gtg aag ggg ttc tac tgt gca gag 391

Gly Gly Thr Leu Asp Asp Phe Tyr Val Lys Gly Phe Tyr Cys Ala Glu

100

105

110

115

tgc cga gca ggc tgg tac gga gga gac tgc atg cga tgt ggc cag gtt 439

Cys Arg Ala Gly Trp Tyr Gly Gly Asp Cys Met Arg Cys Gly Gln Val

120

125

130

4/54

ctg cga gcc cca aag ggt cag att ttg ttg gaa agc tat ccc cta aat 487
Leu Arg Ala Pro Lys Gly Gln Ile Leu Leu Glu Ser Tyr Pro Leu Asn
135 140 145

gct cac tgt gaa tgg acc att cat gct aaa cct ggg ttt gtc atc caa 535
Ala His Cys Glu Trp Thr Ile His Ala Lys Pro Gly Phe Val Ile Gln
150 155 160

cta aga ttt gtc atg ttg agc ctg gag ttt gac tac atg tgc cag tat 583
Leu Arg Phe Val Met Leu Ser Leu Glu Phe Asp Tyr Met Cys Gln Tyr
165 170 175

gac tat gtt gag gtt cgt gat gga gac aac cgc gat ggc cag atc atc 631
Asp Tyr Val Glu Val Arg Asp Gly Asp Asn Arg Asp Gly Gln Ile Ile
180 185 190 195

aag cgt gtc tgt ggc aac gag cgg cca gct cct atc cag agc ata gga 679
Lys Arg Val Cys Gly Asn Glu Arg Pro Ala Pro Ile Gln Ser Ile Gly
200 205 210

tcc tca ctc cac gtc ctc ttc cac tcc gat ggc tcc aag aat ttt gac 727
Ser Ser Leu His Val Leu Phe His Ser Asp Gly Ser Lys Asn Phe Asp
215 220 225

ggt ttc cat gcc att tat gag gag atc aca gca tgc tcc tca tcc cct 775

5/54

Gly Phe His Ala Ile Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Cys Ser Ser Ser Pro

230

235

240

tgt ttc cat gac ggc acg tgc gtc ctt gac aag gct gga cct tac aag 823

Cys Phe His Asp Gly Thr Cys Val Leu Asp Lys Ala Gly Pro Tyr Lys

245

250

255

tgt gcc tgc ttg gca ggc tat act ggg cag cgc tgt gaa aat ctt ctg 871

Cys Ala Cys Leu Ala Gly Tyr Thr Gly Gln Arg Cys Glu Asn Leu Leu

260

265

270

275

gag gct ggg aag tcc aag atc aag gcg tca gaa gat tca ttg tct gtc 919

Glu Ala Gly Lys Ser Lys Ile Lys Ala Ser Glu Asp Ser Leu Ser Val

280

285

290

ctt gaa gaa aga aac tgc tca gac cct ggg ggc cca gtc aat ggg tac 967

Leu Glu Glu Arg Asn Cys Ser Asp Pro Gly Gly Pro Val Asn Gly Tyr

295

300

305

cag aaa ata aca ggg ggc cct ggg ctt atc aac gga cgc cat gct aaa 1015

Gln Lys Ile Thr Gly Gly Pro Gly Leu Ile Asn Gly Arg His Ala Lys

310

315

320

att ggc acc gtg gtg tct ttc ttt tgt aac aac tcc tat gtt ctt agt 1063

Ile Gly Thr Val Val Ser Phe Phe Cys Asn Asn Ser Tyr Val Leu Ser

325

330

335

6/54

ggc aat gag aaa aga act tgc cag cag aat gga gag tgg tca ggg aaa 1111
Gly Asn Glu Lys Arg Thr Cys Gln Gln Asn Gly Glu Trp Ser Gly Lys
340 345 350 355

cag ccc atc tgc ata aaa gcc tgc cga gaa cca aag att tca gac ctg 1159
Gln Pro Ile Cys Ile Lys Ala Cys Arg Glu Pro Lys Ile Ser Asp Leu
360 365 370

gtg aga agg aga gtt ctt ccg atg cag gtt cag tca agg gag aca cca 1207
Val Arg Arg Arg Val Leu Pro Met Gln Val Gln Ser Arg Glu Thr Pro
375 380 385

tta cac cag cta tac tca gcg gcc ttc agc aag cag aaa ctg cag agt 1255
Leu His Gln Leu Tyr Ser Ala Ala Phe Ser Lys Gln Lys Leu Gln Ser
390 395 400

gcc cct acc aag aag cca gcc ctt ccc ttt gga gat ctg ccc atg gga 1303
Ala Pro Thr Lys Lys Pro Ala Leu Pro Phe Gly Asp Leu Pro Met Gly
405 410 415

tac caa cat ctg cat acc cag ctc cag tat gag tgc atc tca ccc ttc 1351
Tyr Gln His Leu His Thr Gln Leu Gln Tyr Glu Cys Ile Ser Pro Phe
420 425 430 435

tac cgc cgc ctg ggc agc agc agg agg aca tgt ctg agg act ggg aag 1399

7/54

Tyr Arg Arg Leu Gly Ser Ser Arg Arg Thr Cys Leu Arg Thr Gly Lys

440

445

450

tgg agt ggg cg^g gca cca tcc tgc atc cct atc tgc ggg aaa att gag 1447

Trp Ser Gly Arg Ala Pro Ser Cys Ile Pro Ile Cys Gly Lys Ile Glu

455

460

465

aac atc act gct cca aag acc caa ggg ttg cgc tgg cc^g tgg cag gca 1495

Asn Ile Thr Ala Pro Lys Thr Gln Gly Leu Arg Trp Pro Trp Gln Ala

470

475

480

gcc atc tac agg agg acc agc ggg gtg cat gac ggc agc cta cac aag 1543

Ala Ile Tyr Arg Arg Thr Ser Gly Val His Asp Gly Ser Leu His Lys

485

490

495

gga gc^g tgg ttc cta gtc tgc agc ggt gcc ctg gtg aat gag cgc act 1591

Gly Ala Trp Phe Leu Val Cys Ser Gly Ala Leu Val Asn Glu Arg Thr

500

505

510

515

gtg gtg gtg gct gc^c cac tgt gtt act gac ctg ggg aag gtc acc atg 1639

Val Val Val Ala Ala His Cys Val Thr Asp Leu Gly Lys Val Thr Met

520

525

530

atc aag aca gca gac ctg aaa gtt gtt ttg ggg aaa ttc tac cgg gat 1687

Ile Lys Thr Ala Asp Leu Lys Val Val Leu Gly Lys Phe Tyr Arg Asp

535

540

545

8/54

gat gac cgg gat gag aag acc atc cag agc cta cag att tct gct atc 1735
Asp Asp Arg Asp Glu Lys Thr Ile Gln Ser Leu Gln Ile Ser Ala Ile
550 555 560

att ctg cat ccc aac tat gac ccc atc ctg ctt gat gct gac atc gcc 1783
Ile Leu His Pro Asn Tyr Asp Pro Ile Leu Leu Asp Ala Asp Ile Ala
565 570 575

atc ctg aag ctc cta gac aag gcc cgt atc agc acc cga gtc cag ccc 1831
Ile Leu Lys Leu Leu Asp Lys Ala Arg Ile Ser Thr Arg Val Gln Pro
580 585 590 595

atc tgc ctc gct gcc agt cgg gat ctc agc act tcc ttc cag gag tcc 1879
Ile Cys Leu Ala Ala Ser Arg Asp Leu Ser Thr Ser Phe Gln Glu Ser
600 605 610

cac atc act gtg gct ggc tgg aat gtc ctg gca gac gtg agg agc cct 1927
His Ile Thr Val Ala Gly Trp Asn Val Leu Ala Asp Val Arg Ser Pro
615 620 625

ggc ttc aag aac gac aca ctg cgc tct ggg gtg gtc agt gtg gtg gac 1975
Gly Phe Lys Asn Asp Thr Leu Arg Ser Gly Val Val Ser Val Val Asp
630 635 640

tcg ctg ctg tgt gag gag cag cat gag gac cat ggc atc cca gtg agt 2023

9/54

Ser Leu Leu Cys Glu Glu Gln His Glu Asp His Gly Ile Pro Val Ser
645 650 655

gtc act gat aac atg ttc tgt gcc agc tgg gaa ccc act gcc cct tct 2071
Val Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Ser Trp Glu Pro Thr Ala Pro Ser
660 665 670 675

gat atc tgc act gca gag aca gga ggc atc gcg gct gtg tcc ttc ccg 2119
Asp Ile Cys Thr Ala Glu Thr Gly Gly Ile Ala Ala Val Ser Phe Pro
680 685 690

gga cga gca tct cct gag cca cgc tgg cat ctg atg gga ctg gtc agc 2167
Gly Arg Ala Ser Pro Glu Pro Arg Trp His Leu Met Gly Leu Val Ser
695 700 705

tgg agc tat gat aaa aca tgc agc cac agg ctc tcc act gcc ttc acc 2215
Trp Ser Tyr Asp Lys Thr Cys Ser His Arg Leu Ser Thr Ala Phe Thr
710 715 720

aag gtg ctg cct ttt aaa gac tgg att gaa aga aat atg aaa 2257
Lys Val Leu Pro Phe Lys Asp Trp Ile Glu Arg Asn Met Lys
725 730 735

tgaaccatgc tcatgcactc cttgagaagt gtttctgtat atccgtctgt acgtgtgtca 2317

ttgcgtgaag cagtgtggc ctgaagtgtg atttggcctg tgaacttggc tgtgccagg 2377

10/54

cttctgactt cagggacaaa actcagtcaa gggtagatgc acctccattt ctggtaggt 2437

gatgccgcgt ccactactag gacagccaaat tggaagatgc cagggcttgc aagaagtaag 2497

tttctcaaa gaagaccata tacaaaacct ctccactcca ctgacctggt ggtcttcccc 2557

aactttcagt tatacgaatg ccatcagctg accaggaaag atctgggctt catgaggccc 2617

cttttgggc tctcaagttc tagagagctg cctgtggac agcccaggc agcagagctg 2677

ggatgtggtg catgcctttg tgtacatggc cacagtacag tctggtcctt ttcttcccc 2737

atctttgtt cacatttaa taaaataagg gttggcttct gaactac 2784

<210> 2

<211> 737

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

Met Glu Leu Gly Cys Trp Thr Gln Leu Gly Leu Thr Phe Leu Gln Leu

1

5

10

15

Leu Leu Ile Ser Ser Leu Pro Arg Glu Tyr Thr Val Ile Asn Glu Ala

20

25

30

11/54

Cys Pro Gly Ala Glu Trp Asn Ile Met Cys Arg Glu Cys Cys Glu Tyr

35

40

45

Asp Gln Ile Glu Cys Val Cys Pro Gly Lys Arg Glu Val Val Gly Tyr

50

55

60

Thr Ile Pro Cys Cys Arg Asn Glu Glu Asn Glu Cys Asp Ser Cys Leu

65

70

75

80

Ile His Pro Gly Cys Thr Ile Phe Glu Asn Cys Lys Ser Cys Arg Asn

85

90

95

Gly Ser Trp Gly Gly Thr Leu Asp Asp Phe Tyr Val Lys Gly Phe Tyr

100

105

110

Cys Ala Glu Cys Arg Ala Gly Trp Tyr Gly Gly Asp Cys Met Arg Cys

115

120

125

Gly Gln Val Leu Arg Ala Pro Lys Gly Gln Ile Leu Leu Glu Ser Tyr

130

135

140

Pro Leu Asn Ala His Cys Glu Trp Thr Ile His Ala Lys Pro Gly Phe

145

150

155

160

Val Ile Gln Leu Arg Phe Val Met Leu Ser Leu Glu Phe Asp Tyr Met

12/54

165

170

175

Cys Gln Tyr Asp Tyr Val Glu Val Arg Asp Gly Asp Asn Arg Asp Gly

180

185

190

Gln Ile Ile Lys Arg Val Cys Gly Asn Glu Arg Pro Ala Pro Ile Gln

195

200

205

Ser Ile Gly Ser Ser Leu His Val Leu Phe His Ser Asp Gly Ser Lys

210

215

220

Asn Phe Asp Gly Phe His Ala Ile Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Cys Ser

225

230

235

240

Ser Ser Pro Cys Phe His Asp Gly Thr Cys Val Leu Asp Lys Ala Gly

245

250

255

Pro Tyr Lys Cys Ala Cys Leu Ala Gly Tyr Thr Gly Gln Arg Cys Glu

260

265

270

Asn Leu Leu Glu Ala Gly Lys Ser Lys Ile Lys Ala Ser Glu Asp Ser

275

280

285

Leu Ser Val Leu Glu Glu Arg Asn Cys Ser Asp Pro Gly Gly Pro Val

290

295

300

13/54

Asn Gly Tyr Gln Lys Ile Thr Gly Gly Pro Gly Leu Ile Asn Gly Arg
305 310 315 320

His Ala Lys Ile Gly Thr Val Val Ser Phe Phe Cys Asn Asn Ser Tyr
325 330 335

Val Leu Ser Gly Asn Glu Lys Arg Thr Cys Gln Gln Asn Gly Glu Trp
340 345 350

Ser Gly Lys Gln Pro Ile Cys Ile Lys Ala Cys Arg Glu Pro Lys Ile
355 360 365

Ser Asp Leu Val Arg Arg Arg Val Leu Pro Met Gln Val Gln Ser Arg
370 375 380

Glu Thr Pro Leu His Gln Leu Tyr Ser Ala Ala Phe Ser Lys Gln Lys
385 390 395 400

Leu Gln Ser Ala Pro Thr Lys Pro Ala Leu Pro Phe Gly Asp Leu
405 410 415

Pro Met Gly Tyr Gln His Leu His Thr Gln Leu Gln Tyr Glu Cys Ile
420 425 430

Ser Pro Phe Tyr Arg Arg Leu Gly Ser Ser Arg Arg Thr Cys Leu Arg
435 440 445

14/54

Thr Gly Lys Trp Ser Gly Arg Ala Pro Ser Cys Ile Pro Ile Cys Gly

450 455 460

Lys Ile Glu Asn Ile Thr Ala Pro Lys Thr Gln Gly Leu Arg Trp Pro

465 470 475 480

Trp Gln Ala Ala Ile Tyr Arg Arg Thr Ser Gly Val His Asp Gly Ser

485 490 495

Leu His Lys Gly Ala Trp Phe Leu Val Cys Ser Gly Ala Leu Val Asn

500 505 510

Glu Arg Thr Val Val Val Ala Ala His Cys Val Thr Asp Leu Gly Lys

515 520 525

Val Thr Met Ile Lys Thr Ala Asp Leu Lys Val Val Leu Gly Lys Phe

530 535 540

Tyr Arg Asp Asp Asp Arg Asp Glu Lys Thr Ile Gln Ser Leu Gln Ile

545 550 555 560

Ser Ala Ile Ile Leu His Pro Asn Tyr Asp Pro Ile Leu Leu Asp Ala

565 570 575

Asp Ile Ala Ile Leu Lys Leu Leu Asp Lys Ala Arg Ile Ser Thr Arg

15/54

580

585

590

Val Gln Pro Ile Cys Leu Ala Ala Ser Arg Asp Leu Ser Thr Ser Phe

595

600

605

Gln Glu Ser His Ile Thr Val Ala Gly Trp Asn Val Leu Ala Asp Val

610

615

620

Arg Ser Pro Gly Phe Lys Asn Asp Thr Leu Arg Ser Gly Val Val Ser

625

630

635

640

Val Val Asp Ser Leu Leu Cys Glu Glu Gln His Glu Asp His Gly Ile

645

650

655

Pro Val Ser Val Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Ser Trp Glu Pro Thr

660

665

670

Ala Pro Ser Asp Ile Cys Thr Ala Glu Thr Gly Gly Ile Ala Ala Val

675

680

685

Ser Phe Pro Gly Arg Ala Ser Pro Glu Pro Arg Trp His Leu Met Gly

690

695

700

Leu Val Ser Trp Ser Tyr Asp Lys Thr Cys Ser His Arg Leu Ser Thr

705

710

715

720

16/54

Ala Phe Thr Lys Val Leu Pro Phe Lys Asp Trp Ile Glu Arg Asn Met

725

730

735

Lys

<210> 3

<211> 2244

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (32)..(2191)

<400> 3

tcactcggtta ccgacacacgc aacggaaac g atg gag cta gac aga tgg gcg 52

Met Glu Leu Asp Arg Trp Ala

1

5

cag ttg ggg ctg gtg ttc ctg cag ctc ctt ctc atc tca tct ttg cca 100

Gln Leu Gly Leu Val Phe Leu Gln Leu Leu Leu Ile Ser Ser Leu Pro

10

15

20

aga gag tac acg gtc att aat gaa gcc tgt ccc gga gct gag tgg aac 148

Arg Glu Tyr Thr Val Ile Asn Glu Ala Cys Pro Gly Ala Glu Trp Asn

17/54

25 30 35

atc atg tgt aga gaa tgt tgt gaa tat gat cag att gaa tgc ctc tgc 196
Ile Met Cys Arg Glu Cys Cys Glu Tyr Asp Gln Ile Glu Cys Leu Cys

40 45 50 55

cca gga aag aag gaa gtg gtg ggt tac acc atc cca tgc tgc agg aat 244
Pro Gly Lys Lys Glu Val Val Gly Tyr Thr Ile Pro Cys Cys Arg Asn

60 65 70

gag gat aat gaa tgt gac tcc tgt cta att cac cca ggt tgt acc atc 292
Glu Asp Asn Glu Cys Asp Ser Cys Leu Ile His Pro Gly Cys Thr Ile

75 80 85

ttt gaa aac tgc aag agc tgc cgc aat ggc tcc tgg ggc gga act ctg 340
Phe Glu Asn Cys Lys Ser Cys Arg Asn Gly Ser Trp Gly Gly Thr Leu

90 95 100

gat gac ttc tac gtg aag gga ttc tac tgc gca gag tgc agg gca ggc 388
Asp Asp Phe Tyr Val Lys Gly Phe Tyr Cys Ala Glu Cys Arg Ala Gly

105 110 115

tgg tac gga gga gac tgc atg cga tgt ggc cag gtt ctt cga gcc tca 436
Trp Tyr Gly Gly Asp Cys Met Arg Cys Gly Gln Val Leu Arg Ala Ser

120 125 130 135

18/54

aag ggt cag atc ttg ttg gag agc tat ccc tta aac gct cac tgt gaa 484
Lys Gly Gln Ile Leu Leu Glu Ser Tyr Pro Leu Asn Ala His Cys Glu

140 145 150

tgg act att cat gcc aga cct ggg ttt atc atc cag ttg agg ttt ggt 532
Trp Thr Ile His Ala Arg Pro Gly Phe Ile Ile Gln Leu Arg Phe Gly

155 160 165

atg ctg agc cta gag ttt gac tac atg tgc caa tat gac tac gtg gag 580
Met Leu Ser Leu Glu Phe Asp Tyr Met Cys Gln Tyr Asp Tyr Val Glu

170 175 180

gtc cgc gat ggg gat aat agt gac agc cct atc atc aag cgt ttc tgt 628
Val Arg Asp Gly Asp Asn Ser Asp Ser Pro Ile Ile Lys Arg Phe Cys

185 190 195

ggc aac gag agg cca gct ccc atc agg agc act ggc tct tca ctc cat 676
Gly Asn Glu Arg Pro Ala Pro Ile Arg Ser Thr Gly Ser Ser Leu His
200 205 210 215

gtc ctt ttc cat tct gat ggc tcc aag aac ttc gat ggc ttc cac gct 724
Val Leu Phe His Ser Asp Gly Ser Lys Asn Phe Asp Gly Phe His Ala

220 225 230

gtc ttt gag gag atc aca gcg tgc tcc tca tcc cct tgt ttc cat gat 772
Val Phe Glu Glu Ile Thr Ala Cys Ser Ser Pro Cys Phe His Asp

19/54

235

240

245

ggc aca tgc ctc ctt gac acc act ggg tct ttc aag tgt gcc tgc ctg 820
Gly Thr Cys Leu Leu Asp Thr Thr Gly Ser Phe Lys Cys Ala Cys Leu

250

255

260

gct ggc tac act ggg cag cgc tgt gaa aat cta ctt gaa gaa aga aac 868
Ala Gly Tyr Thr Gly Gln Arg Cys Glu Asn Leu Leu Glu Glu Arg Asn

265

270

275

tgc tca gac ctt ggg ggg cca gtc aat ggg tac aag aaa atc aca gaa 916
Cys Ser Asp Leu Gly Gly Pro Val Asn Gly Tyr Lys Lys Ile Thr Glu
280 285 290 295

ggt cct gga ctt ctc aat gag cac cat gta aaa att ggc acg gtt gtg 964
Gly Pro Gly Leu Leu Asn Glu His His Val Lys Ile Gly Thr Val Val

300

305

310

tct ttc ttt tgt aac ggc tca tac gtt ctg agt ggc aat gag aaa cga 1012
Ser Phe Phe Cys Asn Gly Ser Tyr Val Leu Ser Gly Asn Glu Lys Arg
315 320 325

act tgc cag cag aat gga gag tgg tca gga aag caa cct gtc tgc atg 1060
Thr Cys Gln Gln Asn Gly Glu Trp Ser Gly Lys Gln Pro Val Cys Met

330

335

340

20/54

aaa gcc tgc cgg gaa ccg aag atc tca gac ctg gtg aga agg aga gtc 1108
Lys Ala Cys Arg Glu Pro Lys Ile Ser Asp Leu Val Arg Arg Arg Val
345 350 355

ctt tcg atg cag gtt cag tca agg gag aca cca tta cat cag ctt tat 1156
Leu Ser Met Gln Val Gln Ser Arg Glu Thr Pro Leu His Gln Leu Tyr
360 365 370 375

tcc acg gct ttc agc aag cag aaa ttg cag gat gcc tct acc aaa aag 1204
Ser Thr Ala Phe Ser Lys Gln Lys Leu Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys
380 385 390

cca gcc ctt cca ttt gga gac ctg ccc cct gga tac caa cat ctg cac 1252
Pro Ala Leu Pro Phe Gly Asp Leu Pro Pro Gly Tyr Gln His Leu His
395 400 405

acc caa gtc cag tat gag tgc atc tcg ccc ttc tac cgc cgc ctg gga 1300
Thr Gln Val Gln Tyr Glu Cys Ile Ser Pro Phe Tyr Arg Arg Leu Gly
410 415 420

agc agc agg agg aca tgc aga act ggg aag tgg agt ggg cgg gcc 1348
Ser Ser Arg Arg Thr Cys Leu Arg Thr Gly Lys Trp Ser Gly Arg Ala
425 430 435

ccg tcc tgt atc cca atc tgt gga aaa atc gag agc act cct tct cca 1396
Pro Ser Cys Ile Pro Ile Cys Gly Lys Ile Glu Ser Thr Pro Ser Pro

21/54

440 445 450 455

aag acc caa ggc acc cgc tgg cca tgg cag gca gcc atc tac cgg agg 1444
Lys Thr Gln Gly Thr Arg Trp Pro Trp Gln Ala Ala Ile Tyr Arg Arg

460 465 470

acc agt ggt gta cac gat ggt ggt ctg cac aaa ggt gca tgg ttc ttg 1492
Thr Ser Gly Val His Asp Gly Gly Leu His Lys Gly Ala Trp Phe Leu

475 480 485

gtc tgc agt ggt gcc ctg gtg aat gaa cgg act gtg gtt gtg gct gcc 1540
Val Cys Ser Gly Ala Leu Val Asn Glu Arg Thr Val Val Val Ala Ala

490 495 500

cac tgt gtg act gag ctg ggg aag gcc acc atc atc aag aca gca gac 1588
His Cys Val Thr Glu Leu Gly Lys Ala Thr Ile Ile Lys Thr Ala Asp

505 510 515

ctc aag gtt gtc ttg gga aaa ttc tac agg gac gat gat cgg gat gag 1636
Leu Lys Val Val Leu Gly Lys Phe Tyr Arg Asp Asp Asp Arg Asp Glu

520 525 530 535

aag agc atc cag aat tta cgg gtt tct gct atc att ctg cac ccc aac 1684
Lys Ser Ile Gln Asn Leu Arg Val Ser Ala Ile Ile Leu His Pro Asn

540 545 550

22/54

tat gac cct atc ctg ctt gac act gac atc gct gtt ctg aag ctc cta 1732
Tyr Asp Pro Ile Leu Leu Asp Thr Asp Ile Ala Val Leu Lys Leu
555 560 565

gac aaa gct cgc atc agt acc cgt gtc caa ccc atc tgc ctg gct acc 1780
Asp Lys Ala Arg Ile Ser Thr Arg Val Gln Pro Ile Cys Leu Ala Thr
570 575 580

act cgg gac ctc agc acc tct ttc cag gaa tcc cac atc act gtg gct 1828
Thr Arg Asp Leu Ser Thr Ser Phe Gln Glu Ser His Ile Thr Val Ala
585 590 595

ggc tgg aac atc ctg gca gat gtg agg agc cct ggc ttt aag aat gat 1876
Gly Trp Asn Ile Leu Ala Asp Val Arg Ser Pro Gly Phe Lys Asn Asp
600 605 610 615

acc tta cat tat gga atg gtc aga gtg gta gac cca atg ctt tgt gag 1924
Thr Leu His Tyr Gly Met Val Arg Val Val Asp Pro Met Leu Cys Glu
620 625 630

gaa cag cat gaa gac cat ggc att cca gtt agt gtc act gac aac atg 1972
Glu Gln His Glu Asp His Gly Ile Pro Val Ser Val Thr Asp Asn Met
635 640 645

ttc tgt gcc agc aaa gat ccc agt acc cct tct gac atc tgc act gca 2020
Phe Cys Ala Ser Lys Asp Pro Ser Thr Pro Ser Asp Ile Cys Thr Ala

23/54

650

655

660

gag aca ggg ggc atc gct gct ttg tcc ttc cca ggc cga gca tcc ccc 2068
Glu Thr Gly Gly Ile Ala Ala Leu Ser Phe Pro Gly Arg Ala Ser Pro

665

670

675

gag cca cgc tgg cat ttg gtg ggg ctg gtc agc tgg agc tat gac aag 2116
Glu Pro Arg Trp His Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Ser Tyr Asp Lys
680 685 690 695

aca tgt agc aat ggc cta tcc aca gcc ttc aca aag gtg ttg ccg ttc 2164
Thr Cys Ser Asn Gly Leu Ser Thr Ala Phe Thr Lys Val Leu Pro Phe

700

705

710

aaa gac tgg att gag aga aac atg aaa tgaaccagcc acaaggccac 2211
Lys Asp Trp Ile Glu Arg Asn Met Lys

715

720

tgagaaggcct tttccttagca tccgtctgta cat 2244

<210> 4

<211> 720

<212> PRT

<213> Mus musculus

24/54

<400> 4

Met Glu Leu Asp Arg Trp Ala Gln Leu Gly Leu Val Phe Leu Gln Leu

1

5

10

15

Leu Leu Ile Ser Ser Leu Pro Arg Glu Tyr Thr Val Ile Asn Glu Ala

20

25

30

Cys Pro Gly Ala Glu Trp Asn Ile Met Cys Arg Glu Cys Cys Glu Tyr

35

40

45

Asp Gln Ile Glu Cys Leu Cys Pro Gly Lys Lys Glu Val Val Gly Tyr

50

55

60

Thr Ile Pro Cys Cys Arg Asn Glu Asp Asn Glu Cys Asp Ser Cys Leu

65

70

75

80

Ile His Pro Gly Cys Thr Ile Phe Glu Asn Cys Lys Ser Cys Arg Asn

85

90

95

Gly Ser Trp Gly Gly Thr Leu Asp Asp Phe Tyr Val Lys Gly Phe Tyr

100

105

110

Cys Ala Glu Cys Arg Ala Gly Trp Tyr Gly Gly Asp Cys Met Arg Cys

115

120

125

Gly Gln Val Leu Arg Ala Ser Lys Gly Gln Ile Leu Leu Glu Ser Tyr

25/54

130 135 140

Pro Leu Asn Ala His Cys Glu Trp Thr Ile His Ala Arg Pro Gly Phe

145 150 155 160

Ile Ile Gln Leu Arg Phe Gly Met Leu Ser Leu Glu Phe Asp Tyr Met

165 170 175

Cys Gln Tyr Asp Tyr Val Glu Val Arg Asp Gly Asp Asn Ser Asp Ser

180 185 190

Pro Ile Ile Lys Arg Phe Cys Gly Asn Glu Arg Pro Ala Pro Ile Arg

195 200 205

Ser Thr Gly Ser Ser Leu His Val Leu Phe His Ser Asp Gly Ser Lys

210 215 220

Asn Phe Asp Gly Phe His Ala Val Phe Glu Glu Ile Thr Ala Cys Ser

225 230 235 240

Ser Ser Pro Cys Phe His Asp Gly Thr Cys Leu Leu Asp Thr Thr Gly

245 250 255

Ser Phe Lys Cys Ala Cys Leu Ala Gly Tyr Thr Gly Gln Arg Cys Glu

260 265 270

26/54

Asn Leu Leu Glu Glu Arg Asn Cys Ser Asp Leu Gly Gly Pro Val Asn
275 280 285

Gly Tyr Lys Lys Ile Thr Glu Gly Pro Gly Leu Leu Asn Glu His His
290 295 300

Val Lys Ile Gly Thr Val Val Ser Phe Phe Cys Asn Gly Ser Tyr Val
305 310 315 320

Leu Ser Gly Asn Glu Lys Arg Thr Cys Gln Gln Asn Gly Glu Trp Ser
325 330 335

Gly Lys Gln Pro Val Cys Met Lys Ala Cys Arg Glu Pro Lys Ile Ser
340 345 350

Asp Leu Val Arg Arg Arg Val Leu Ser Met Gln Val Gln Ser Arg Glu
355 360 365

Thr Pro Leu His Gln Leu Tyr Ser Thr Ala Phe Ser Lys Gln Lys Leu
370 375 380

Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Pro Ala Leu Pro Phe Gly Asp Leu Pro
385 390 395 400

Pro Gly Tyr Gln His Leu His Thr Gln Val Gln Tyr Glu Cys Ile Ser
405 410 415

27/54

Pro Phe Tyr Arg Arg Leu Gly Ser Ser Arg Arg Thr Cys Leu Arg Thr

420

425

430

Gly Lys Trp Ser Gly Arg Ala Pro Ser Cys Ile Pro Ile Cys Gly Lys

435

440

445

Ile Glu Ser Thr Pro Ser Pro Lys Thr Gln Gly Thr Arg Trp Pro Trp

450

455

460

Gln Ala Ala Ile Tyr Arg Arg Thr Ser Gly Val His Asp Gly Gly Leu

465

470

475

480

His Lys Gly Ala Trp Phe Leu Val Cys Ser Gly Ala Leu Val Asn Glu

485

490

495

Arg Thr Val Val Val Ala Ala His Cys Val Thr Glu Leu Gly Lys Ala

500

505

510

Thr Ile Ile Lys Thr Ala Asp Leu Lys Val Val Leu Gly Lys Phe Tyr

515

520

525

Arg Asp Asp Asp Arg Asp Glu Lys Ser Ile Gln Asn Leu Arg Val Ser

530

535

540

Ala Ile Ile Leu His Pro Asn Tyr Asp Pro Ile Leu Leu Asp Thr Asp

28/54

545 550 555 560

Ile Ala Val Leu Lys Leu Leu Asp Lys Ala Arg Ile Ser Thr Arg Val

565 570 575

Gln Pro Ile Cys Leu Ala Thr Thr Arg Asp Leu Ser Thr Ser Phe Gln

580 585 590

Glu Ser His Ile Thr Val Ala Gly Trp Asn Ile Leu Ala Asp Val Arg

595 600 605

Ser Pro Gly Phe Lys Asn Asp Thr Leu His Tyr Gly Met Val Arg Val

610 615 620

Val Asp Pro Met Leu Cys Glu Glu Gln His Glu Asp His Gly Ile Pro

625 630 635 640

Val Ser Val Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Ser Lys Asp Pro Ser Thr

645 650 655

Pro Ser Asp Ile Cys Thr Ala Glu Thr Gly Gly Ile Ala Ala Leu Ser

660 665 670

Phe Pro Gly Arg Ala Ser Pro Glu Pro Arg Trp His Leu Val Gly Leu

675 680 685

29/54

Val Ser Trp Ser Tyr Asp Lys Thr Cys Ser Asn Gly Leu Ser Thr Ala
690 695 700

Phe Thr Lys Val Leu Pro Phe Lys Asp Trp Ile Glu Arg Asn Met Lys
705 710 715 720

<210> 5

<211> 2289

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence:an artifdicial sequence

<400> 5

atg gag ctg ggt tgc tgg acg cag ttg ggg ctc act ttt ctt cag ctc 48
Met Glu Leu Gly Cys Trp Thr Gln Leu Gly Leu Thr Phe Leu Gln Leu
1 5 10 15

ctt ctc atc tcg tcc ttg cca aga gag tac aca gtc att aat gaa gcc 96
Leu Leu Ile Ser Ser Leu Pro Arg Glu Tyr Thr Val Ile Asn Glu Ala
20 25 30

tgc cct gga gca gag tgg aat atc atg tgt cgg gag tgc tgt gaa tat 144
Cys Pro Gly Ala Glu Trp Asn Ile Met Cys Arg Glu Cys Cys Glu Tyr
35 40 45

gat cag att gag tgc gtc tgc ccc gga aag agg gaa gtc gtg ggt tat 192
Asp Gln Ile Glu Cys Val Cys Pro Gly Lys Arg Glu Val Val Gly Tyr

30/54

50

55

60

acc atc cct tgc tgc agg aat gag gag aat gag tgt gac tcc tgc ctg 240
Thr Ile Pro Cys Cys Arg Asn Glu Glu Asn Glu Cys Asp Ser Cys Leu

65

70

75

80

atc cac cca ggt tgt acc atc ttt gaa aac tgc aag agc tgc cga aat 288
Ile His Pro Gly Cys Thr Ile Phe Glu Asn Cys Lys Ser Cys Arg Asn

85

90

95

ggc tca tgg ggg ggt acc ttg gat gac ttc tat gtg aag ggg ttc tac 336
Gly Ser Trp Gly Gly Thr Leu Asp Asp Phe Tyr Val Lys Gly Phe Tyr

100

105

110

tgt gca gag tgc cga gca ggc tgg tac gga gga gac tgc atg cga tgt 384
Cys Ala Glu Cys Arg Ala Gly Trp Tyr Gly Gly Asp Cys Met Arg Cys

115

120

125

ggc cag gtt ctg cga gcc cca aag ggt cag att ttg ttg gaa agc tat 432
Gly Gln Val Leu Arg Ala Pro Lys Gly Gln Ile Leu Leu Glu Ser Tyr

130

135

140

ccc cta aat gct cac tgt gaa tgg acc att cat gct aaa cct ggg ttt 480
Pro Leu Asn Ala His Cys Glu Trp Thr Ile His Ala Lys Pro Gly Phe

145

150

155

160

31/54

gtc atc caa cta aga ttt gtc atg ttg agc ctg gag ttt gac tac atg 528
Val Ile Gln Leu Arg Phe Val Met Leu Ser Leu Glu Phe Asp Tyr Met
165 170 175

tgc cag tat gac tat gtt gag gtt cgt gat gga gac aac cgc gat ggc 576
Cys Gln Tyr Asp Tyr Val Glu Val Arg Asp Gly Asp Asn Arg Asp Gly
180 185 190

cag atc atc aag cgt gtc tgt ggc aac gag cgg cca gct cct atc cag 624
Gln Ile Ile Lys Arg Val Cys Gly Asn Glu Arg Pro Ala Pro Ile Gln
195 200 205

agc ata gga tcc tca ctc cac gtc ctc ttc cac tcc gat ggc tcc aag 672
Ser Ile Gly Ser Ser Leu His Val Leu Phe His Ser Asp Gly Ser Lys
210 215 220

aat ttt gac ggt ttc cat gcc att tat gag gag atc aca gca tgc tcc 720
Asn Phe Asp Gly Phe His Ala Ile Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Cys Ser
225 230 235 240

tca tcc cct tgt ttc cat gac ggc acg tgc gtc ctt gac aag gct gga 768
Ser Ser Pro Cys Phe His Asp Gly Thr Cys Val Leu Asp Lys Ala Gly
245 250 255

cct tac aag tgt gcc tgc ttg gca ggc tat act ggg cag cgc tgt gaa 816
Pro Tyr Lys Cys Ala Cys Leu Ala Gly Tyr Thr Gly Gln Arg Cys Glu

32/54

260

265

270

aat ctt ctg gag gct ggg aag tcc aag atc aag gcg tca gaa gat tca 864
Asn Leu Leu Glu Ala Gly Lys Ser Lys Ile Lys Ala Ser Glu Asp Ser

275

280

285

ttg tct gtc ctt gaa gaa aga aac tgc tca gac cct ggg ggc cca gtc 912
Leu Ser Val Leu Glu Glu Arg Asn Cys Ser Asp Pro Gly Gly Pro Val
290 295 300

aat ggg tac cag aaa ata aca ggg ggc cct ggg ctt atc aac gga cgc 960
Asn Gly Tyr Gln Lys Ile Thr Gly Gly Pro Gly Leu Ile Asn Gly Arg
305 310 315 320

cat gct aaa att ggc acc gtg gtg tct ttc ttt tgt aac aac tcc tat 1008
His Ala Lys Ile Gly Thr Val Val Ser Phe Phe Cys Asn Asn Ser Tyr
325 330 335

gtt ctt agt ggc aat gag aaa aga act tgc cag cag aat gga gag tgg 1056
Val Leu Ser Gly Asn Glu Lys Arg Thr Cys Gln Gln Asn Gly Glu Trp
340 345 350

tca ggg aaa cag ccc atc tgc ata aaa gcc tgc cga gaa cca aag att 1104
Ser Gly Lys Gln Pro Ile Cys Ile Lys Ala Cys Arg Glu Pro Lys Ile
355 360 365

33/54

tca gac ctg gtg aga agg aga gtt ctt ccg atg cag gtt cag tca agg 1152
Ser Asp Leu Val Arg Arg Arg Val Leu Pro Met Gln Val Gln Ser Arg
370 375 380

gag aca cca tta cac cag cta tac tca gcg gcc ttc agc aag cag aaa 1200
Glu Thr Pro Leu His Gln Leu Tyr Ser Ala Ala Phe Ser Lys Gln Lys
385 390 395 400

ctg cag agt gcc cct acc aag aag cca gcc ctt ccc ttt gga gat ctg 1248
Leu Gln Ser Ala Pro Thr Lys Lys Pro Ala Leu Pro Phe Gly Asp Leu
405 410 415

ccc atg gga tac caa cat ctg cat acc cag ctc cag tat gag tgc atc 1296
Pro Met Gly Tyr Gln His Leu His Thr Gln Leu Gln Tyr Glu Cys Ile
420 425 430

tca ccc ttc tac cgc cgc ctg ggc agc agc agg agg aca tgt ctg agg 1344
Ser Pro Phe Tyr Arg Arg Leu Gly Ser Ser Arg Arg Thr Cys Leu Arg
435 440 445

act ggg aag tgg agt ggg cgg gca cca tcc tgc atc cct atc tgc ggg 1392
Thr Gly Lys Trp Ser Gly Arg Ala Pro Ser Cys Ile Pro Ile Cys Gly
450 455 460

aaa att gag aac atc act gct cca aag acc caa ggg ttg cgc tgg ccg 1440
Lys Ile Glu Asn Ile Thr Ala Pro Lys Thr Gln Gly Leu Arg Trp Pro

34/54

465 470 475 480

tgg cag gca gcc atc tac agg agg acc agc ggg gtg cat gac ggc agc 1488
Trp Gln Ala Ala Ile Tyr Arg Arg Thr Ser Gly Val His Asp Gly Ser

485 490 495

cta cac aag gga gcg tgg ttc cta gtc tgc agc ggt gcc ctg gtg aat 1536
Leu His Lys Gly Ala Trp Phe Leu Val Cys Ser Gly Ala Leu Val Asn

500 505 510

gag cgc act gtg gtg gtg gct gcc cac tgt gtt act gac ctg ggg aag 1584
Glu Arg Thr Val Val Val Ala Ala His Cys Val Thr Asp Leu Gly Lys

515 520 525

gtc acc atg atc aag aca gca gac ctg aaa gtt gtt ttg ggg aaa ttc 1632
Val Thr Met Ile Lys Thr Ala Asp Leu Lys Val Val Leu Gly Lys Phe

530 535 540

tac cgg gat gat gac cgg gat gag aag acc atc cag agc cta cag att 1680
Tyr Arg Asp Asp Asp Arg Asp Glu Lys Thr Ile Gln Ser Leu Gln Ile
545 550 555 560

tct gct atc att ctg cat ccc aac tat gac ccc atc ctg ctt gat gct 1728
Ser Ala Ile Ile Leu His Pro Asn Tyr Asp Pro Ile Leu Leu Asp Ala

565 570 575

35/54

gac atc gcc atc ctg aag ctc cta gac aag gcc cgt atc agc acc cga 1776
Asp Ile Ala Ile Leu Lys Leu Leu Asp Lys Ala Arg Ile Ser Thr Arg
580 585 590

gtc cag ccc atc tgc ctc gct gcc agt cgg gat ctc agc act tcc ttc 1824
Val Gln Pro Ile Cys Leu Ala Ala Ser Arg Asp Leu Ser Thr Ser Phe
595 600 605

cag gag tcc cac atc act gtg gct ggc tgg aat gtc ctg gca gac gtg 1872
Gln Glu Ser His Ile Thr Val Ala Gly Trp Asn Val Leu Ala Asp Val
610 615 620

agg agc cct ggc ttc aag aac gac aca ctg cgc tct ggg gtg gtc agt 1920
Arg Ser Pro Gly Phe Lys Asn Asp Thr Leu Arg Ser Gly Val Val Ser
625 630 635 640

gtg gtg gac tcg ctg ctg tgt gag gag cag cat gag gac cat ggc atc 1968
Val Val Asp Ser Leu Leu Cys Glu Glu Gln His Glu Asp His Gly Ile
645 650 655

cca gtg agt gtc act gat aac atg ttc tgt gcc agc tgg gaa ccc act 2016
Pro Val Ser Val Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Ser Trp Glu Pro Thr
660 665 670

gcc cct tct gat atc tgc act gca gag aca gga ggc atc gcg gct gtg 2064
Ala Pro Ser Asp Ile Cys Thr Ala Glu Thr Gly Gly Ile Ala Ala Val

36/54

675 680 685

tcc ttc ccg gga cga gca tct cct gag cca cgc tgg cat ctg atg gga 2112
Ser Phe Pro Gly Arg Ala Ser Pro Glu Pro Arg Trp His Leu Met Gly

690 695 700

ctg gtc agc tgg agc tat gat aaa aca tgc agc cac agg ctc tcc act 2160
Leu Val Ser Trp Ser Tyr Asp Lys Thr Cys Ser His Arg Leu Ser Thr
705 710 715 720

gcc ttc acc aag gtg ctg cct ttt aaa gac tgg att gaa aga aat atg 2208
Ala Phe Thr Lys Val Leu Pro Phe Lys Asp Trp Ile Glu Arg Asn Met
725 730 735

aaa aag ctt ggg ccc gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat 2256
Lys Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
740 745 750

agc gcc gtc gac cat cat cat cat cat tga 2289
Ser Ala Val Asp His His His His His
755 760

<210> 6

<211> 762

<212> PRT

<223> Description of Artificial Sequence: an artificial sequence

37/54

<400> 6

Met Glu Leu Gly Cys Trp Thr Gln Leu Gly Leu Thr Phe Leu Gln Leu

1 5 10 15

Leu Leu Ile Ser Ser Leu Pro Arg Glu Tyr Thr Val Ile Asn Glu Ala

20 25 30

Cys Pro Gly Ala Glu Trp Asn Ile Met Cys Arg Glu Cys Cys Glu Tyr

35 40 45

Asp Gln Ile Glu Cys Val Cys Pro Gly Lys Arg Glu Val Val Gly Tyr

50 55 60

Thr Ile Pro Cys Cys Arg Asn Glu Glu Asn Glu Cys Asp Ser Cys Leu

65 70 75 80

Ile His Pro Gly Cys Thr Ile Phe Glu Asn Cys Lys Ser Cys Arg Asn

85 90 95

Gly Ser Trp Gly Gly Thr Leu Asp Asp Phe Tyr Val Lys Gly Phe Tyr

100 105 110

Cys Ala Glu Cys Arg Ala Gly Trp Tyr Gly Gly Asp Cys Met Arg Cys

115 120 125

Gly Gln Val Leu Arg Ala Pro Lys Gly Gln Ile Leu Leu Glu Ser Tyr

38/54

130 135 140

Pro Leu Asn Ala His Cys Glu Trp Thr Ile His Ala Lys Pro Gly Phe

145 150 155 160

Val Ile Gln Leu Arg Phe Val Met Leu Ser Leu Glu Phe Asp Tyr Met

165 170 175

Cys Gln Tyr Asp Tyr Val Glu Val Arg Asp Gly Asp Asn Arg Asp Gly

180 185 190

Gln Ile Ile Lys Arg Val Cys Gly Asn Glu Arg Pro Ala Pro Ile Gln

195 200 205

Ser Ile Gly Ser Ser Leu His Val Leu Phe His Ser Asp Gly Ser Lys

210 215 220

Asn Phe Asp Gly Phe His Ala Ile Tyr Glu Glu Ile Thr Ala Cys Ser

225 230 235 240

Ser Ser Pro Cys Phe His Asp Gly Thr Cys Val Leu Asp Lys Ala Gly

245 250 255

Pro Tyr Lys Cys Ala Cys Leu Ala Gly Tyr Thr Gly Gln Arg Cys Glu

260 265 270

39/54

Asn Leu Leu Glu Ala Gly Lys Ser Lys Ile Lys Ala Ser Glu Asp Ser

275 280 285

Leu Ser Val Leu Glu Glu Arg Asn Cys Ser Asp Pro Gly Gly Pro Val

290 295 300

Asn Gly Tyr Gln Lys Ile Thr Gly Gly Pro Gly Leu Ile Asn Gly Arg

305 310 315 320

His Ala Lys Ile Gly Thr Val Val Ser Phe Phe Cys Asn Asn Ser Tyr

325 330 335

Val Leu Ser Gly Asn Glu Lys Arg Thr Cys Gln Gln Asn Gly Glu Trp

340 345 350

Ser Gly Lys Gln Pro Ile Cys Ile Lys Ala Cys Arg Glu Pro Lys Ile

355 360 365

Ser Asp Leu Val Arg Arg Val Leu Pro Met Gln Val Gln Ser Arg

370 375 380

Glu Thr Pro Leu His Gln Leu Tyr Ser Ala Ala Phe Ser Lys Gln Lys

385 390 395 400

Leu Gln Ser Ala Pro Thr Lys Lys Pro Ala Leu Pro Phe Gly Asp Leu

405 410 415

40/54

Pro Met Gly Tyr Gln His Leu His Thr Gln Leu Gln Tyr Glu Cys Ile

420

425

430

Ser Pro Phe Tyr Arg Arg Leu Gly Ser Ser Arg Arg Thr Cys Leu Arg

435

440

445

Thr Gly Lys Trp Ser Gly Arg Ala Pro Ser Cys Ile Pro Ile Cys Gly

450

455

460

Lys Ile Glu Asn Ile Thr Ala Pro Lys Thr Gln Gly Leu Arg Trp Pro

465

470

475

480

Trp Gln Ala Ala Ile Tyr Arg Arg Thr Ser Gly Val His Asp Gly Ser

485

490

495

Leu His Lys Gly Ala Trp Phe Leu Val Cys Ser Gly Ala Leu Val Asn

500

505

510

Glu Arg Thr Val Val Val Ala Ala His Cys Val Thr Asp Leu Gly Lys

515

520

525

Val Thr Met Ile Lys Thr Ala Asp Leu Lys Val Val Leu Gly Lys Phe

530

535

540

Tyr Arg Asp Asp Asp Arg Asp Glu Lys Thr Ile Gln Ser Leu Gln Ile

41/54

545 550 555 560

Ser Ala Ile Ile Leu His Pro Asn Tyr Asp Pro Ile Leu Leu Asp Ala

565 570 575

Asp Ile Ala Ile Leu Lys Leu Leu Asp Lys Ala Arg Ile Ser Thr Arg

580 585 590

Val Gln Pro Ile Cys Leu Ala Ala Ser Arg Asp Leu Ser Thr Ser Phe

595 600 605

Gln Glu Ser His Ile Thr Val Ala Gly Trp Asn Val Leu Ala Asp Val

610 615 620

Arg Ser Pro Gly Phe Lys Asn Asp Thr Leu Arg Ser Gly Val Val Ser

625 630 635 640

Val Val Asp Ser Leu Leu Cys Glu Glu Gln His Glu Asp His Gly Ile

645 650 655

Pro Val Ser Val Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Ser Trp Glu Pro Thr

660 665 670

Ala Pro Ser Asp Ile Cys Thr Ala Glu Thr Gly Gly Ile Ala Ala Val

675 680 685

42/54

Ser Phe Pro Gly Arg Ala Ser Pro Glu Pro Arg Trp His Leu Met Gly
690 695 700

Leu Val Ser Trp Ser Tyr Asp Lys Thr Cys Ser His Arg Leu Ser Thr
705 710 715 720

Ala Phe Thr Lys Val Leu Pro Phe Lys Asp Trp Ile Glu Arg Asn Met
725 730 735

Lys Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
740 745 750

Ser Ala Val Asp His His His His His
755 760

<210> 7

<211> 30

<212> RNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized
oligo-cap linker sequence

<400> 7

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg 30

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

43/54

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized
oligo(dT) primer sequence

<400> 8

gcggctgaag acggcctatg tggcctttt tttttttt tt

42

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer
sequence

<400> 9

agcatcgagt cggccttgtt g

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer
sequence

<400> 10

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer
sequence

44/54

<400> 12

tacggaagtg ttacttctgc

20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 12

tgtgggaggt ttttctcta

20

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

gttttccag tcacgac

17

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

45/54

cagggaaacag ctatgac

17

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 15

tgtctgagga ctgggaagtg

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 16

tgccatggtc ctcatgctgc

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 17

atggagctgg gttgctggac

17

46/54

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 18

tttcatattt ctttcaatcc

20

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 19

gaaagcttagc atggagctgg gttgctggac

30

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 20

aaaaaagctt tttcatattt ctttcaatcc

30

<210> 21

<211> 20

47/54

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 21

cactgcttac tggcttatcg

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 22

cttatcaacg gacgccatgc

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 23

cctgaagctc ctagacaagg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer

48/54

sequence

<400> 24

gcactctgca cagtagaaacc

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 25

aagggtccagc cttgtcaagg

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 26

ccttgactga acctgcatcg

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 27

49/54

ccaggtcagt aacacagtgg

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 28

tgccatggtc ctcatgctgc

20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 29

tcactcggtt ccgacacagc

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 30

atgtacagac ggatgctagg

20

50/54

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 31

ctatttagt gacactatag

20

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 32

gtaatacgac tcactatagg gc

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 33

gattctactg cgcagagtgc

20

<210> 34

<211> 20

51/54

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 34

gtcttgagg agatcacagc

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 35

cagaatggag agtggtcagg

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 36

tctccaaaga cccaaggcac

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer

52/54

sequence

<400> 37

ggtttctgct atcattctgc

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 38

atctgcactg cagagacagg

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 39

catgcagtct cctccgtacc

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 40

53/54

gaaacaaggg gatgaggagc

20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 41

ggactctcct tctcaccagg

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 42

catcgtagtac accactggtc

20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 43

tctggatgct cttctcatcc

20

54/54

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence

<400> 44

catggtcttc atgctgttcc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.C1' C12N15/57, C12N9/64, C12N15/63, C12N5/06, C07K16/40, C12Q1/68,
 G01N33/573, A61K38/48, A61K31/7052, A61K48/00
 //C12P21/08, (C12N9/64, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1' C12N15/57, C12N9/64, C12N15/63, C12N5/06, C07K16/40, C12Q1/68,
 G01N33/573, A61K38/48, A61K31/7052, A61K48/00, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| PX | WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.), 09 December, 1999 (09.12.99) & AU, 9943286, A | 1-10 |
| A | GB, 9712088, A (SmithKline Beecham p.l.c.), 13 August, 1997 (13.08.97) & EP, 890646, A2 & JP, 11-98992, A | 1-10 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

| | | | |
|-----|---|-----|--|
| "A" | Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" | earlier document but published on or after the international filing date | "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" | document member of the same patent family |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |

Date of the actual completion of the international search
19 October, 2000 (19.10.00)

Date of mailing of the international search report
31 October, 2000 (31.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/05062

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/57, C12N9/64, C12N15/63, C12N5/06, C07K16/40,
 C12Q1/68, G01N33/573, A61K38/48, A61K31/7052, A61K48/00
 //C12P21/08, (C12N9/64, C12R1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/57, C12N9/64, C12N15/63, C12N5/06, C07K16/40,
 C12Q1/68, G01N33/573, A61K38/48, A61K31/7052, A61K48/00,
 C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| P X | WO, 99/63088, A2 (GENENTECH, INC.) 9日. 12月. 1999 (09. 12. 99) & AU, 9943286, A | 1-10 |
| A | GB, 9712088, A (SmithKline Beecham p.l.c.) 13 日. 8月. 1997 (13. 08. 97) & EP, 89064 6, A2 & JP, 11-98992, A | 1-10 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 10. 00

国際調査報告の発送日

31.10.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

本間 夏子



4 N 9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488